

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Análisis del proceso de regeneración *in situ* en
los discos imaginales de
Drosophila melanogaster

Memoria presentada por

Sandra Díaz García

para optar al grado de Doctor en Ciencias por

la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2013

Director de la tesis:

Dr. Antonio Baonza Cuenca

Tutor de la tesis:

Prof. Jose Feliz de Celis Ibeas

**Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología
Molecular; Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(C.S.I.C – U.A.M)**

A mi familia

Índice

RESUMEN/SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Biología del desarrollo	9
2. Drosophila melanogaster como organismo modelo	11
3. El desarrollo de Drosophila melanogaster	12
4. Desarrollo de los discos imaginales	13
4.1. El desarrollo del disco imaginal de ala	14
4.1.1. Subdivisión del disco imaginal de ala en compartimen- tos.	14
4.1.2. Formación del patrón de venas	16
5. Regeneración	17
6. Análisis de la regeneración de órganos en los discos imaginales de Drosophila melanogaster	20
6.1 Regeneración en Drosophila: Precedentes	20
6.2 Inducción de crecimiento regenerativo mediante la ablación genética de tejidos	23
6.3 Genes requeridos durante la regeneración: Rutas de Señal- ización y su papel putativo en regeneración del disco de ala	26
6.3.1 La ruta de las c-Jun N-terminal kinasas	26
6.3.2 Señalización de Wnt	28
6.3.3 Señalización de la ruta de Notch	28
6.3.4 Ruta de señalización de Janus kinasa-Señal transductora y activadora de la transcripción (JAK-STAT)	29
6.3.5 Ruta de señalización de Hippo	30
6.3.6 Otras señales que son activadas durante la regenera- ción	32
6.3.7 Epigenética en las heridas	32
6.4. Apoptosis	34
7. Desarrollo de un nuevo método para el análisis de regeneración “in situ”	36
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	53
1. Caracterización del método de ablación in situ de un fragmento del disco imaginal de ala.	55
2. Caracterización del patrón de división celular en discos imaginales	

de ala regenerados	60
3. Caracterización del patrón de muerte celular en discos imaginales de ala regenerados	62
4. Caracterización de los cambios en la expresión de genes implicados en la formación de patrón durante la regeneración	63
5. Caracterización del comportamiento de los bordes de compartimento durante la regeneración	67
6. Análisis de los cambios en la expresión de Wg en el borde D/V durante el proceso de regeneración	70
7. Estudio del requerimiento de Wg durante la regeneración	74
8. Modelo proximo- distal	79
9. La actividad de la ruta de señalización de Notch se reduce durante los estadios tempranos de la regeneración	79
10. La reorganización del tejido y marcadores de patrón durante la regeneración es independiente de la proliferación celular	81
11. Reorganización de tejido durante la regeneración	86
12. Plasticidad del disco imaginal	87
13. Epigenética	89
14. Posibles rutas de señalización implicadas en la regeneración del disco imaginal de ala en Drosophila	92
15. Importancia de la muerte celular durante el proceso de regeneración	98
16. Desarrollo de un metodo de estudio de reorganización de patrón “in vitro”	101
 DISCUSIÓN	 103
1. Análisis de estructuras adultas	105
2. Patrón y tamaño del ala regenerada	106
3. Papel de wg durante la regeneración de los discos	107
4. Función de señalización de Notch durante la regeneración	109
5. Alteración en los bordes de compartimento	110
6. Muerte celular durante la regeneración	111
7. Integración de las distintas vías de señalización durante la regeneración del disco de ala	112
8. Fases de regeneración del disco imaginal de ala.	113
9. Epimorfosis vs morfálaxis	113
 CONCLUSIONES	 115
 BIBLIOGRAFÍA	 121
 ANEXO I: Abreviaturas	 137
ANEXO II: Agradecimientos	143
ANEXO III: Publicaciones	151

Resumen/Summary

Existen muchos animales que muestran una gran capacidad para regenerar tejidos e incluso órganos completos. Cuáles son los procesos celulares y genéticos que controlan esta capacidad es uno de los problemas más interesantes de la biología del desarrollo. Los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* son un sistema modelo idóneo para estudiar este proceso. El método clásico para estudiar la regeneración en *Drosophila* ha sido la realización de cultivos *in vitro* e *in vivo* de tejidos fragmentados. Una de las desventajas de estos métodos, es que es imposible reproducir las condiciones fisiológicas que se producen durante el desarrollo normal. Además, el tipo de manipulación al que se ven sometidos los discos, les provoca un estrés severo que da lugar a distintas respuestas celulares no asociadas a la regeneración, como incremento de la muerte celular o una parada temporal de la división. Recientemente, ha sido desarrollado un método “no-quirúrgico” para la inducción de muerte celular masiva en regiones concretas de los discos de forma temporal, después de la cual, se puede analizar el proceso de recuperación de los mismos. Esta técnica imita algunos aspectos de la ablación microquirúrgica, aunque hay diferencias importantes entre estos dos métodos. Por ejemplo, la sobreexpresión de un inductor de muerte celular no es suficiente para matar todas las células del territorio diana, de manera que co-existen células vivas con células que están muriendo, lo que permitiría el intercambio de señales entre ellas.

En esta tesis presentamos una nueva técnica que hemos desarrollado para eliminar una parte del disco imaginal del ala dentro de la larva, sin necesidad de romper la cutícula. De esta forma, podemos estudiar el proceso regenerativo en las condiciones fisiológicas en las que ocurre el desarrollo. Usando este método hemos analizado diferentes aspectos de la regeneración del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.

Los resultados presentados en este trabajo indican que durante las primeras etapas de la regeneración del disco de ala, además de la formación del blastema, se da un proceso de reorganización de tejido y patrón, independiente de proliferación celular, que puede afectar a grandes territorios del disco. Durante este proceso, se altera la expresión de genes de patrón y se pierden temporalmente marcadores de destino celular. Este proceso inicial se asemeja en algunos aspectos a la regeneración que sigue un modelo morfoláctico. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la función de Wingless (Wg) es prescindible durante las primeras etapas de la regeneración. La expresión de *wg* es regulada por una bajada de actividad de la ruta de Notch, cuyo papel en el disco de ala es fundamental para el crecimiento de ésta y una correcta formación del patrón.

Por último, hemos analizado si la expresión temporal ectópica de miembros de distintas rutas de señalización que se activan en el borde de la herida tras la amputación, eran suficientes para reproducir los efectos que suceden durante la regeneración .

Many animals have the capacity to regenerate tissue or even a complete body part. Understanding the mechanism by which this process is regulated is one of the most interesting problems in developmental biology. The imaginal discs of *Drosophila melanogaster* are a suitable model system for studying this process. A standard approach to studying regeneration in *Drosophila* involves *in vitro* and *in vivo* culture of the regenerating structures. One of the disadvantages of these approaches is that the regeneration does not occur under physiological conditions. In addition, disc extraction and transplantation into the host causes severe stress to the discs, which induces cell death and a temporal arrest on cell proliferation. Recently, a nonsurgical method has been developed to inflict tissue damage and regeneration in *Drosophila* by inducing apoptosis in specific domains of the discs for a specific period of time, after which the discs can recover. This tissue damage technique mimics some aspects of microsurgical ablation, although there are important differences between these two methods. For instance, the overexpression of a cell-death inducer is not sufficient to kill all of the cells in the targeted regions, thus, dying cells may co-exist with living cells.

In this study we have developed a new method to study regeneration using *Drosophila* imaginal discs as a model. With this system, it is possible to remove a section of the disc *in situ*, without damage to the cuticle. This method allows us to study disc regeneration in its normal developmental context. Furthermore, it is possible to study whether the process of regeneration affects the final size and pattern of the adult wings. By using this method we have addressed, and revisited, different aspects of the regenerative process that have so far remained unclear, such as the role of cell proliferation during the early stages of regeneration. The results presented in this work suggest that disc regeneration can be divided into different phases: wound healing, dedifferentiation, which cause temporary loss of markers of cell fate commitment, and pattern reorganisation. We provide evidence indicating that these processes can proceed even in the absence of cell proliferation. In addition, we have investigated the role of *wingless* (*wg*) during regeneration, and our results indicate that the function of Wg is dispensable during the early stages of regeneration and its expression is down-regulated as a consequence of a reduction in Notch signalling.

Finally, we have analyzed whether the ectopic temporal expression of different members signaling pathways that are activated on the edge of the wound after amputation, were sufficient to reproduce the effects that occur during regeneration.

Introducción

1. Biología del desarrollo

Cómo desde una semilla se puede desarrollar una planta, o cómo una simple célula es capaz de dar lugar a un animal adulto con toda su complejidad morfológica, son preguntas que clásicamente han intrigado al hombre, como ponen de manifiesto los trabajos sobre el desarrollo embriológico realizados por Hipócrates (460 a.C. – 370 a.C.) y Aristóteles (384 a.C. – 322 a.C.).

Todos los organismos multicelulares se desarrollan a partir de un cigoto, resultado de la unión de dos gametos, masculino y femenino. Las células que constituyen el cigoto comienzan un proceso de división durante el cual se suceden fenómenos de diferenciación y especificación celular para dar lugar a los tejidos y órganos que conforman un individuo. La función de cada órgano está determinada por los tipos celulares que lo constituyen. Todos estos procesos están genéticamente regulados y son comunes en gran medida en todos los organismos multicelulares, es decir, están evolutivamente conservados.

Dentro del campo de la Biología, la biología del desarrollo es la disciplina que estudia los mecanismos por los cuales una única célula, a través de distintos procesos como crecimiento celular, proliferación, apoptosis, diferenciación y morfogénesis, da lugar a un individuo adulto. Una vez el organismo alcanza la etapa adulta, tiene que enfrentarse a distintas contingencias, tanto externas como internas, que pueden causarle daños y poner en riesgo su supervivencia. De manera que todos los organismos tienen en menor o mayor medida, la capacidad de recuperarse frente a daños internos, como fallos en el proceso de diferenciación durante su desarrollo, o externas a él, como accidentes físicos, depredaciones, infecciones, etc. Esta capacidad, conocida como regeneración, está conservada en distinta medida dentro de cada taxón y juega un papel primordial a la hora de reactivar el programa de desarrollo para la recuperación del organismo o la reconstrucción de la estructura perdida o dañada.

Existe un amplio rango de respuestas regenerativas que incluyen desde el cierre de heridas o cicatrización, a la inducción de crecimiento para la reconstrucción total de un órgano dañado o, incluso, del organismo completo. Cómo un organismo puede reemplazar órganos o estructuras perdidas es uno de los problemas más interesantes del campo de la biología del desarrollo. Este proceso es posible gracias a que los planes de desarrollo corporales no son rígidos e irreversibles. Si no fuera así, la eliminación de una pequeña parte del cuerpo de un organismo podría suponer su muerte.

La alta conservación de los procesos regenerativos, vías de señalización y regulación génica que se suceden durante el desarrollo de los distintos individuos, permite utilizar or-

ganismos modelo más simples para caracterizar procesos que luego pueden ser extrapolados a organismos más complejos (Figura I 1).

A lo largo de la historia se han utilizado distintos organismos modelo para el estudio de los procesos regenerativos. Nosotros nos hemos centrado en estudiar los distintos procesos celulares y genéticos que ocurren durante la regeneración del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster* (Figura I 1), estructura epitelial larvaria que dará lugar al ala adulta de *Drosophila*.

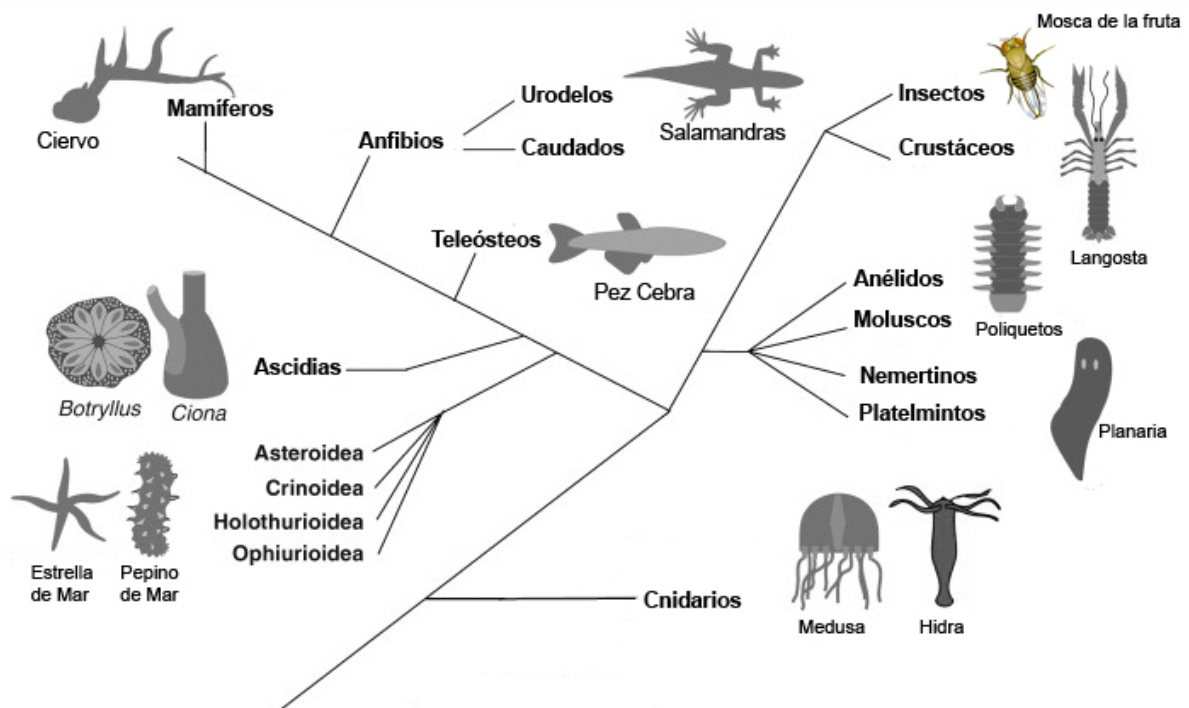


Figura I 1. El proceso de Regeneración se da en todo el árbol evolutivo de los metazoos. En este esquema se muestran ejemplos de cómo en cada phyla se conoce al menos un ejemplo de organismo con capacidad de regeneración. Las especies representadas tienen alto potencial regenerativo y proporcionan distintos sistemas modelo útiles para el estudio de este proceso. (modificada de The *Hydra* model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration Brigitte Galliot , Simona Chera)

2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Tras ser descrita inicialmente por los entomólogos Johann Wilhem Meigen y Joseph Albert Lintner, *Drosophila melanogaster* comenzó a ser utilizada como organismo modelo por la escuela de Thomas Hunt Morgan y los «drosofilistas» para realizar estudios genéticos entre finales del s.XIX principios del s.XX (Figura I 2). Durante el último siglo *Drosophila* ha sido ampliamente utilizada para el estudio de diferentes problemas biológicos, de manera que se han desarrollado multitud de herramientas genéticas y moleculares. Su éxito como sistema modelo radica en su ciclo de vida corto (10 días a 25°C), en que es fácil de mantener en el laboratorio y en que presenta un genoma de pequeño tamaño, con baja redundancia génica y que además está altamente conservado evolutivamente.

La disponibilidad de las secuencias del genoma, la fácil manipulación genética, y la larga colección de mutantes disponibles, hacen de *Drosophila* un atractivo sistema que permite analizar los detalles moleculares de los procesos involucrados en el desarrollo de un individuo (Botas 2007).

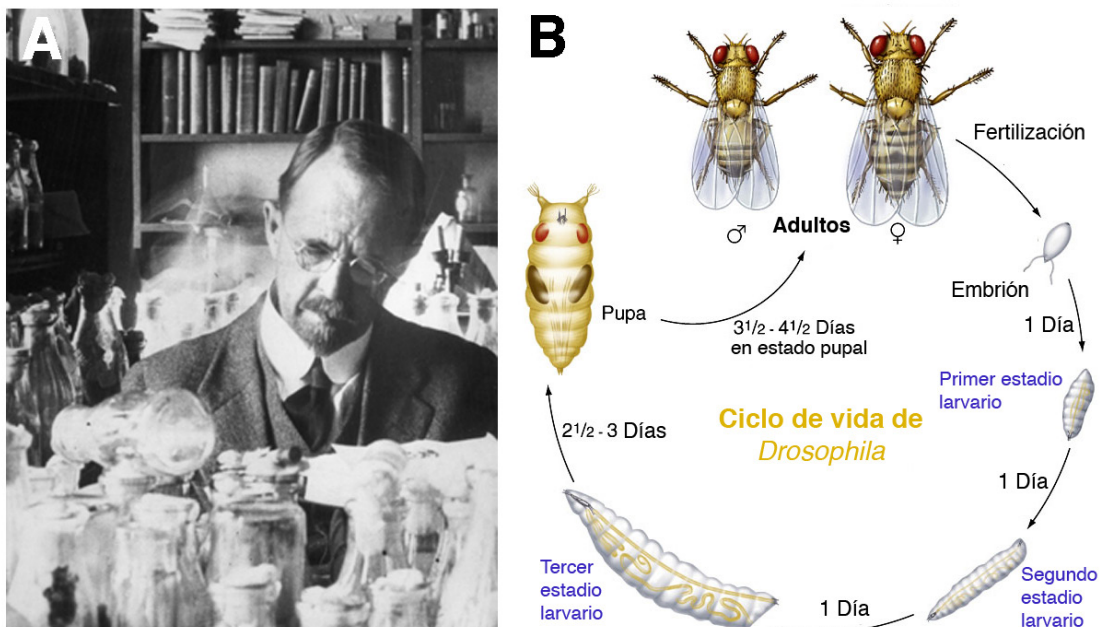


Figura I 2. (A) Thomas H. Morgan (1910) trabajando con *Drosophila*. Fotografía de un artículo publicado por Gerry Rubin y E.B. Lewis. (B) Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* donde se muestran las distintas fases del desarrollo de *Drosophila* y su duración. A 25°C, transcurridas 24 horas de desarrollo embrionario (Embrión), la larva sufre dos mudas que separan tres fases larvarias (1^{er}, 2^o y 3^{er} estadio larvario). La fase pupal se inicia el 6^o día (Prepupa) y dura aproximadamente tres días (Pupa), tras la cual sale el adulto o Imago. Modificado de Mc Graw-Hill Companies.

3. El desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, que por lo tanto sufre una metamorfosis completa después de pasar por diferentes estadios larvarios. Después de la puesta del huevo se sucede la embriogénesis (24 horas), tras la que nace una larva que pasa por tres estadios larvarios, separados entre sí por una muda de cutícula, antes de la metamorfosis que se produce durante la fase de pupa. Concluida la fase pupal eclosiona un individuo adulto (Figura I 2) (Shingleton, 2010).

Durante la metamorfosis, la mayor parte de los tejidos larvarios son reabsorbidos y reemplazados por las estructuras adultas. La mayoría de los órganos adultos se desarrollan a partir de los discos imaginales. Estos son unas estructuras epiteliales con forma de saco que derivan del ectodermo embrionario y se encuentran ancladas a la cutícula larvaria. Hay 21 discos imaginales, dos series simétricas de 10 discos a cada lado del cuerpo, que forman la cabeza y el torax con sus respectivos apéndices (apéndices cefálicos, alas, halterios, patas...), y un último disco de simetría bilateral que constituye la analia y la genitalia (Figura I 3).

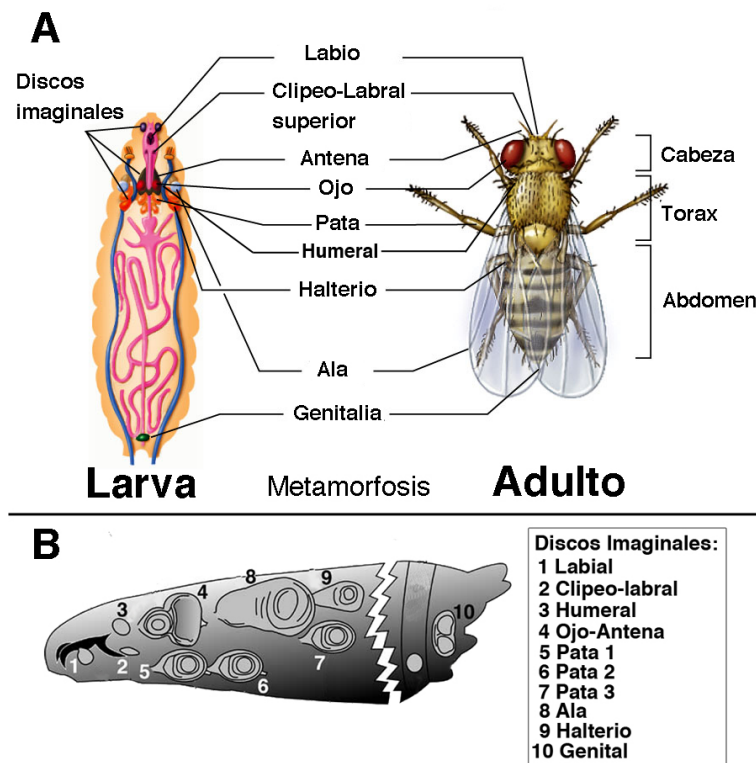


Figura I 3. Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*. Representación esquemática de los discos imaginales y las estructuras correspondientes a las que dará lugar en el individuo adulto. (A) Disposición de los discos imaginales en la larva y la correspondiente estructura a la que darán lugar en el adulto, después de la metamorfosis. Las estructuras adultas correspondientes a cada disco imaginal se muestran conectadas por líneas. (B) Esquema del aspecto de los distintos discos imaginales en la larva. Sus nombres se indican mediante un código de números en la columna de la derecha. Modificado de Mc GrawHill de Lewis I. Held, Jr.

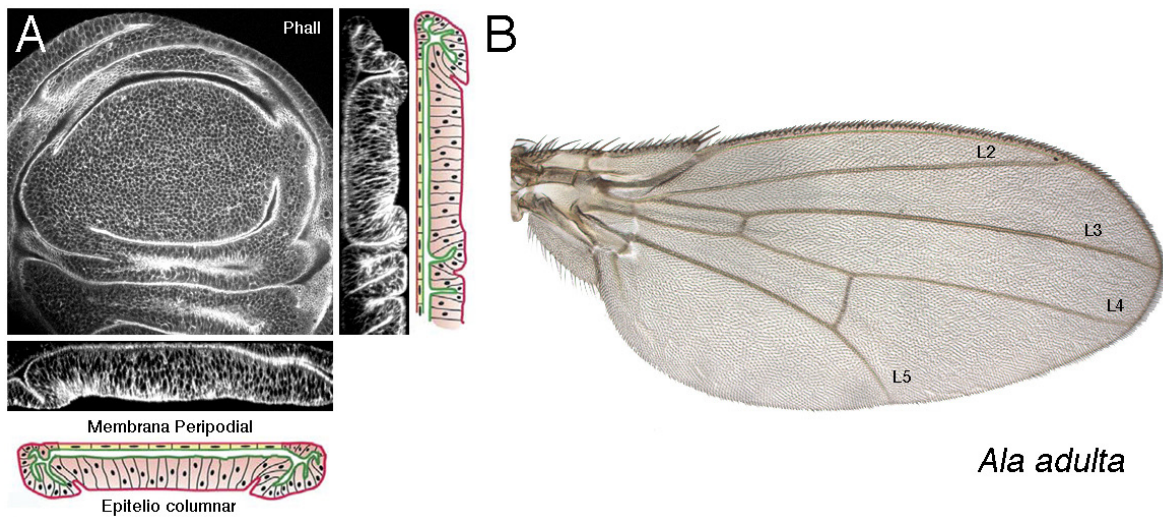


Figura I 4. Disco imaginal de ala y ala adulta. (A) Sección de microscopía confocal de la región de ala del disco imaginal de ala de una larva de tercer estadio en el que se marca la F-actina con Phalloidina (gris). Abajo y a la derecha del disco aparecen las secciones transversal y longitudinal del disco, respectivamente, y una representación esquemática de las mismas indicando la membrana peripodial y el epitelio columnar. (B) Ala adulta de *Drosophila melanogaster* indicando la posición de las venas longitudinales (L2-L5) (Cedido por Cristina Molnar Muro).

4. Desarrollo de los discos imaginales

Los discos imaginales se originan a partir de un grupo de entre 10 a 40 células que se especifican en posiciones fijas del ectodermo durante la embriogénesis (Bate and Martínez-Arias 1991; Cohen 1993; Goto 1997). Durante el desarrollo larvario, los primordios de los discos proliferan dando lugar a sacos epiteliales formados por dos capas: un epitelio columnar pseudoestratificado (EC) y una membrana llamada epitelio escamoso peripodial (EP), el cual es requerido para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Fristrom 1993; Pastor-Pareja et al., 2004) (Figura I 4).

Cada disco imaginal dará lugar a estructuras independientes, por lo que hay un disco para cada pata, ala, halterio y antena (Wolpert 1998; Gilbert 2013) (Figura I 3). El abdomen deriva de células denominadas histoblastos, las cuales proliferan durante el estadio pupal (Cohen et al. 1993; García-Bellido and Merriam 1971). Al llegar el momento de la metamorfosis, las células de los discos dejan de proliferar y comienzan a diferenciarse. Durante la pupación, se produce la histólisis de los tejidos larvarios y la evaginación de los discos imaginales maduros (Pastor-Pareja et al., 2004). Finalmente, la formación del organismo adulto, requiere la fusión de los discos imaginales para formar una cutícula continua en la cabeza y el torax, y la de los nidos de histoblastos para formar el abdomen (Fristrom et al., 1977; Martín-Blanco et al., 2000; Pastor-Pareja et al., 2004).

Los discos imaginales son muy útiles para el estudio del desarrollo epitelial, dada la facilidad de aislar estos tejidos de la larva y observar en ellos directamente la expresión de genes involucrados en la morfogénesis de las estructuras a las que darán lugar en el adulto.

4.1. El desarrollo del disco imaginal de ala

El ala y el tórax de *Drosophila* se originan a partir del disco imaginal de ala. Cada disco de ala da lugar a un ala adulta y a la mitad del tórax. Las células precursoras de este disco comienzan a dividirse al final del primer estadio larvario y continúan proliferando hasta el final del desarrollo larvario. Más tarde, durante la pupación, hay dos rondas adicionales de división celular. Durante la metamorfosis los dos discos de ala se fusionan para dar lugar al tórax completo y a las dos alas características del adulto de *Drosophila*. Ambas estructuras tienen un tamaño y una forma característica, así como un patrón de diferenciación de elementos cuticulares constante. El ala se caracteriza por un patrón formado por cinco venas longitudinales y dos transversales, además de diferentes órganos sensoriales en el margen. El tórax es una estructura de forma redondeada con un patrón de elementos sensoriales constituido por macroquetas y microquetas. El número de estos elementos sensoriales es constante y forman un patrón invariante. Ambas estructuras están unidas mediante la axila del ala, que es una estructura articulada que permite su movimiento. Todos los elementos que constituyen el patrón del ala adulta comienzan a determinarse durante el desarrollo larvario (Figura I 5).

4.1.1. Subdivisión del disco imaginal de ala en compartimentos

Durante el desarrollo, el disco de ala se divide en unidades de linaje llamadas compartimentos. La primera división ocurre en el primordio embrionario del disco y define los compartimentos posterior y anterior. Esta primera compartimentalización depende de la expresión del gen *engrailed* (*en*) en las células del compartimento posterior (Kornberg et al., 1985). La subdivisión del disco tiene como consecuencia la expresión localizada de moléculas de señalización en los bordes entre compartimentos (Figura I 5). Así, la expresión de *engrailed* en las células del compartimento posterior es suficiente para activar al gen *hedgehog* (*hh*). Este gen codifica una proteína difusible que promueve la expresión en las células del compartimento anterior del miembro de la superfamilia del TGFbeta, *decapentaplegic* (*dpp*) (Lawrence and Struhl 1996; Raftery et al., 1991; Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995). Dpp es una proteína secretable y su activación en el borde Anterior-Posterior (A/P) da lugar a un

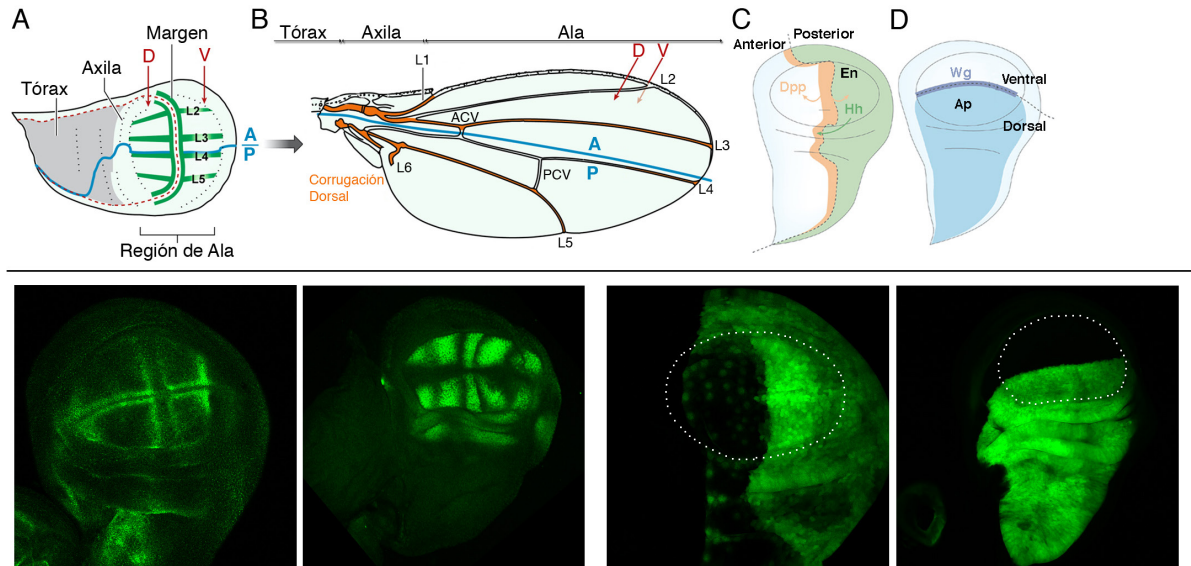


Figura 15. Desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*. (A) Esquema del disco imaginal de ala mostrando los bordes de compartimento anterior-posterior (A/P; línea azul) y dorsal-ventral (D/V; línea roja). En verde aparecen marcadas las regiones que darán lugar al margen del ala y las venas L2, L3, L4 y L5. Se indica mediante una línea discontinua la región que dará lugar al tórax, axila y ala. (B) Representación esquemática del ala adulta mostrando las venas longitudinales (L1-L6) y las venas transversales (ACV y PCV). Las regiones posterior (P) y anterior (A) aparecen separadas por una línea azul, y mediante flechas rojas se indica las superficies dorsal (D) y ventral (V) del ala. (C-D) Representación esquemática del disco imaginal de ala indicando la posición de los compartimentos A y P (azul y verde, respectivamente en C) y de los compartimentos dorsal y ventral (azul oscuro y claro, respectivamente en D). Las células posteriores expresan el gen *engrailed* (*en*) y el ligando *hedgehog* (*Hh*), que induce la expresión del gen *decapentaplegic* (*dpp*; naranja en C) en las células anteriores, y las células dorsales expresan el gen *apterous* (*ap*). En las células del borde D/V se activa la ruta Notch, que a su vez activará la expresión del gen *wingless* (*Wg*; azul oscuro en D). Modificado de Blair SS. (2007) y Kiecker C. y Lumsden A. (2005) (Cedido Por María Fernández-Organista). (E) Expresión de Delta (Dl), ligando de la ruta de Notch en las regiones de vena. (F) Expresión de Blistered (Bs) que se expresa en el territorio de intervena. (G) Expresión de *engrailed* (*en*) que marca el compartimento Posterior y *apterous* (*ap*) que marca el compartimento dorsal (H).

gradiente de concentración de forma que cada célula en el disco, dependiendo de su distancia al borde A/P, estará expuesta a distintos niveles de este factor. Este gradiente de actividad juega un papel fundamental en el control de la proliferación del disco del ala, así como en la definición del patrón de vena e intervena que se ven en el ala adulta (Burke and Basler 1996) (Martin-Castellanos and Edgar 2002; Martin, Perez-Garijo et al. 2004; Schwank et al. 2011). Tras la definición del borde A/P el disco se vuelve a subdividir en nuevos compartimentos. La expresión restringida del gen selector *apterous* (*ap*) en una región del disco de ala define el compartimento dorsal a la vez que el ventral (Diaz-Benjumea and Cohen 1993). Como consecuencia de esta nueva compartimentalización del disco se activa la función de la ruta de Notch, que induce la expresión del gen *wingless* (*wg*) en el nuevo borde Dorso/Ventral (borde D/V) (Diaz-Benjumea, F. J. et al., 1995; de Celis, J. F. et al., 1996). Wingless codifica una proteína secretable que difunde desde el borde D/V y que juega una función fundamental en el control de la proliferación y la formación del patrón del ala, de manera,

que cada uno de los bordes definidos entre compartimentos tiene una función crítica como centro organizador.

La definición de las características finales del ala dependen, además de la división celular, de otros procesos como son tamaño celular, control de la apoptosis y la formación de patrón (Martin and Morata 2006).

4.1.2. Formación del patrón de venas

Las venas son estructuras cuticulares que confieren rigidez estructural al ala y están formadas por células con una menor superficie apical y una mayor pigmentación que las células de intervena (Garcia-Bellido and de Celis 1992). El ala de *Drosophila* se compone de 5 venas longitudinales completas (L1-L5) y dos venas transversales (a-cv y p-cv), que conectan las venas longitudinales L3-L4 y L4-L5 respectivamente. En la región más anterior del ala encontramos la vena longitudinal L1. Cada vena tiene un componente dorsal y uno ventral que se especifican independientemente en el disco en crecimiento y se fusionan tras la aposición de las superficies dorsal y ventral del disco de ala (Garcia-Bellido and de Celis 1992). La formación de las venas es un ejemplo de patrón espacial de tipos celulares diferenciados y requiere la contribución de rutas de señalización y la expresión diferencial de factores de transcripción. Durante el desarrollo larvario la expresión de distintos marcadores prefiguran el patrón de vena/intervena del adulto. El proceso de subdivisión en compartimentos y centros organizadores es seguido por la formación de pequeños dominios celulares desde los cuales se especificarán diferentes destinos celulares para dar lugar a cada una de las estructuras adultas, incluyendo las venas del ala y los órganos sensoriales del tórax (de Celis 2003). En el caso de la definición del patrón de venas en primer lugar, ocurre una subdivisión del ala en territorios de provena e intervena. En segundo lugar se produce la activación de rutas de señalización celular que mantienen o restringen el destino celular de vena en cada provena, y por último, durante el desarrollo pupal, ocurre la diferenciación de las células que forman las venas (de Celis 2003).

Como hemos descrito anteriormente la expresión de *en* en el compartimento posterior da lugar a la activación de Hh (Sanicola et al., 1995; Guillen et al., 1995; Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995) que difunde hacia el compartimento anterior donde activa la expresión de genes diana de la ruta (Mullor et al., 1997; Methot and Basler 1999). Uno de ellos es el factor de transcripción Knot (Kn), que se activa en el intervalo de provenas L3-L4 (Mohler et al., 2000; Nestoras et al., 1997; Vervoort et al., 1999), cuya función se requiere para activar al gen *blistered* (*bs*), que se expresa en las células de intervena y cuya función es requerida

para prevenir la formación de venas. *Kn* también contribuye a la expresión de *extramacrochaetae* (*emc*) y *Notch* (*N*) en la intervena L3-L4, y reprime la expresión de EGFR en este territorio (Crozatier et al. 2002). EGFR a su vez reprime la expresión de *Bs* que promueve la diferenciación de intervena. Además, la actividad de la ruta de Hh es responsable de regular la expresión de los genes que codifican los factores de transcripción del complejo *Iroquois* (*C-Iro*) en la provena L3 (Gomez-Skarmeta and Modolell 1996). Los genes *C-Iro* se expresan en las provenas L1, L3 y L5, y son necesarios para la regulación de *rhomboid* (*rho*), que participa en el correcto procesamiento del ligando EGFR, y activa la transcripción de *Delta* (*DI*), que es uno de los ligandos de Notch (Gómez-Skarmeta et al., 1996). El papel de Notch en este proceso consiste en definir el grosor final de las venas. *DI* es expresado en las provenas de forma que su función es requerida para activar a Notch en los bordes de las venas reprimiendo su formación.

5. Regeneración

Aunque los seres humanos han sido conscientes desde la antigüedad de la capacidad de algunos organismos para regenerarse, como se muestra por ejemplo en el mito clásico de Prometeo y la regeneración del hígado, fue en 1712 cuando el científico francés René-Antoine Ferchault de Réaumur realizó uno de los primeros estudios sistemáticos en regeneración a partir de sus observaciones sobre la capacidad regenerativa de las extremidades del cangrejo de río. El siglo XVIII fue un momento muy importante en el desarrollo de este campo. El tema central era la dicotomía entre preformismo y epigénesis, ya propuesta por Aristóteles en su obra “La Generación de los Animales” (350 A.C.). Probablemente el investigador más influyente en este campo en el siglo XVIII fue Abraham Trembley, considerado el fundador del estudio moderno de la regeneración por de sus trabajos sobre Hydra. Siguiendo un enfoque cuantitativo y riguroso, describió cómo pequeñas piezas de pólipos eran capaces de regenerar un nuevo animal completo. Otro de los personajes más influyentes de aquella época, fue Lazzaro Spallanzani (1729-1799), que llevó a cabo los primeros estudios detallados sobre la regeneración en vertebrados, donde describe, por ejemplo, cómo los tritones y renacuajos eran capaces de regenerar sus extremidades y cola (Figura I 6).

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan, biólogo evolutivo, genetista y embriólogo, propuso dos modelos diferentes de regeneración: la regeneración que permite la reconstrucción de la estructura perdida como resultado del crecimiento “de novo”, y la regeneración que remodela la tejidos restantes sin un aumento de proliferación (Morgan 1901). El primer modelo es una regeneración “sumatoria” que se conoce

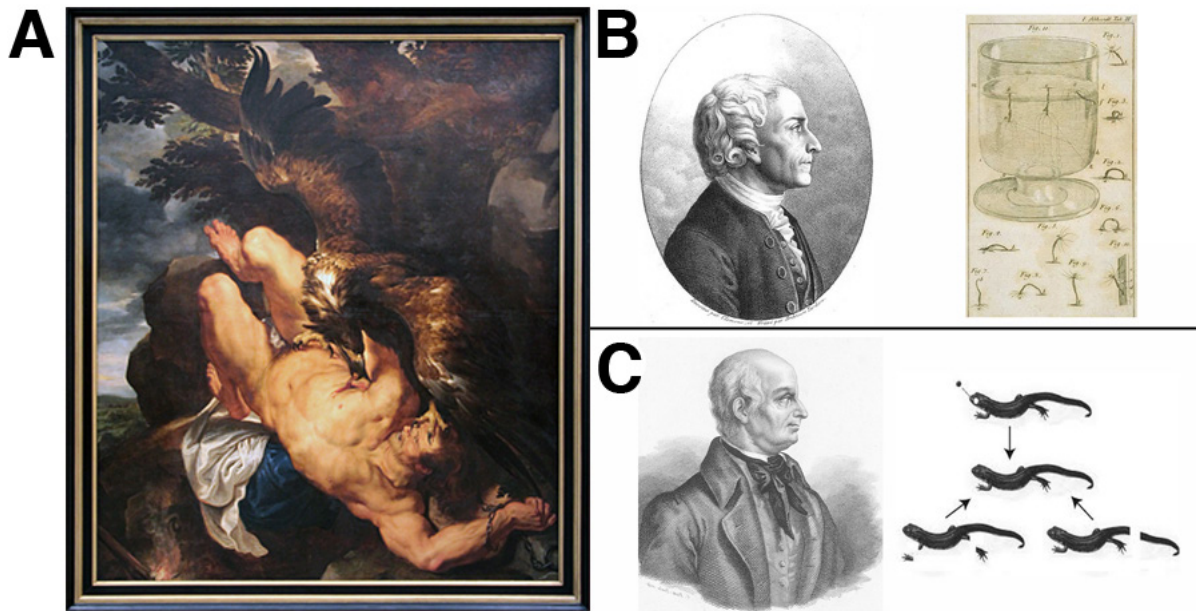


Figura I 6. (A) El Prometeo capturado, óleo de Peter Paul Rubens, pintor barroco (1611 – 1612) en la que se muestra el mito de prometeo, en el cual Zeus como venganza le hace encadenar, y envía un águila para que se comiera el hígado de Prometeo. Siendo éste inmortal, su hígado volvía a crecerle cada noche, y el águila volvía a comérselo cada día.

(B) Abraham Trembley. (1710 - 1784) fue un naturalista suizo. Es conocido principalmente por ser el primero en estudiar las hidras y uno de los primeros que desarrolló la zoología experimental. Trembley descubrió la capacidad regenerativa de la Hidra. (C) Lazzaro Spallanzani. (1729- 1799) Biólogo italiano, demostró que algunos animales, especialmente los tritones, pueden regenerar algunas partes del cuerpo que han sufrido una lesión o se han eliminado quirúrgicamente.

como la regeneración epimórfica. La regeneración epimórfica implica la reconstrucción de la estructura perdida como resultado de un crecimiento regenerativo (Brockes and Kumar 2008). Este tipo de regeneración ha sido estudiado extensamente durante la regeneración de extremidades de organismos como urodelos, anfibios y durante la regeneración del corazón y la aleta de pez cebra (Poss et al., 2002; Akimenko et al., 2003). Tras la amputación de una parte de una extremidad en estos animales, un grupo de células diferenciadas cerca de la región lesionada, comienza a de-diferenciarse y formar el blastema, un tejido con una alta capacidad proliferativa. Este tejido prolifera, para reconstruir la estructura amputada (Figura I 7).

Por el contrario, en el segundo modelo propuesto de regeneración, llamado “regeneración morfoláctica”, hay un proceso de remodelación de tejidos, y de de-diferenciación de las células sin necesidad de que se produzca un aumento de la proliferación. Organismos como la hidra, siguen este modelo (Sanchez Alvarado and Tsonis 2006). Cuando se elimina una sección del cuerpo de la hidra, hay un proceso de reorganización de tejido que resulta

en un individuo más pequeño pero completo, derivado enteramente de los tejidos restantes del animal original (Figura I 7).

Un aspecto interesante de la regeneración es que esta capacidad no sólo es diferente entre especies distintas, sino también entre diferentes fases del desarrollo del mismo organismo. Uno de estos organismos es *Drosophila melanogaster*. La mayoría de los órganos de adultos de este insecto no son capaces de regenerarse, sin embargo los primordios de los tejidos adultos, los discos imaginales, conservan una capacidad regenerativa que se pierde durante el desarrollo (Bryant 1971). Los discos de *Drosophila* se han utilizado como un sistema experimental en el que analizar la regeneración (Bergantinos et al., 2010).

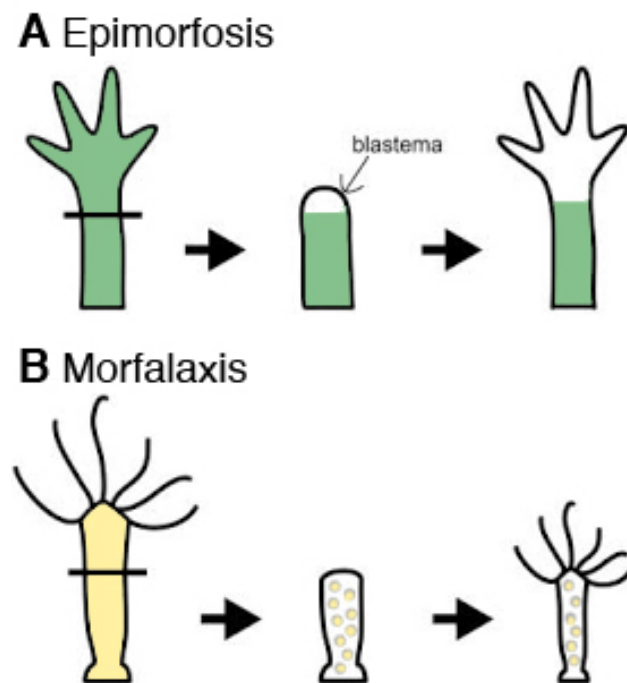


Figura I 7. Esquema simplificado de los dos modelos clásicos de regeneración. (A) Epimorfosis, regeneración que depende de la formación de crecimiento de nuevo, en la que se precisa de la formación del blastema. Típica de urodelos y anfibios, (B) Morfalaxis, regeneración en la que los tejidos preexistentes sufren una remodelación para dar otro individuo igual que el original pero de menor tamaño.

6. Análisis de la regeneración de órganos en los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*

6.1. Regeneración en *Drosophila*: Precedentes

Estudios previos han demostrado que durante el desarrollo de los discos imaginales éstos poseen capacidad regenerativa. Cuando un disco imaginal sufre una herida, se promueven una serie de procesos que inician la regeneración del tejido dañado.

El método clásico para estudiar regeneración en *Drosophila* ha sido el trasplante y cultivo *in vivo* de los discos en regeneración. Para ello, el disco es extraído de la larva, y después de la eliminación de un fragmento, el disco tratado se trasplanta al abdomen de un huésped (una hembra adulta), donde las células de los discos proliferarán, pero no diferenciarán (Hadorn et al., 1959; Bodenstein 1943). Después de varios días en cultivo (hasta semanas) el disco se extrae y se analiza (Hadorn et al., 1968; Bryant 1971). Alternativamente se puede inducir la diferenciación de las células que constituyen los discos si éstos son extraídos y trasplantados dentro de larvas de tercer estadio. Los discos trasplantados tras la metamorfosis diferencian junto con el resto de los discos de la larva huésped, lo que permite analizar los elementos de patrón generados tras el proceso de regeneración. El resultado obtenido con estos experimentos mostró que las células del disco tienen un destino celular que se especifica durante el desarrollo larvario, por lo que fue posible establecer un mapa de destino celular de las diferentes regiones de los discos (Hadorn et al., 1968; Bryant 1971).

Se ha observado que uno de los primeros eventos asociados a la regeneración es el cierre de la herida. Tras la amputación de un fragmento del disco, tanto la membrana peripodial (EP) como el epitelio columnar (EC) se curvan la una hacia la otra, de forma que se produce el contacto entre ambos epitelios, lo que se denomina contacto heterotípico. Durante este proceso, se observa en el borde de la herida la formación de un cable rico en actina. Este incremento de actina se produce en ambos epitelios, siendo más evidente a lo largo del borde del EP. Después del contacto inicial, las células del EP y del EC comienzan a alargarse y a emitir filopodios, los cuales permitirán la unión de ambos lados de la herida. La herida comienza a cerrarse por la parte basolateral del epitelio, desde distal hacia proximal (Reinhardt, Hodgkin et al. 1977) (Bryant, French et al. 1981). Numerosos experimentos han mostrado que durante o incluso antes del cierre de la herida, en los bordes de esta, se observa una zona de alta tasa de proliferación celular. Este proceso es similar a la formación del blastema que ocurre durante la regeneración de extremidades en anfibios (Figura 1.8) (Repiso et al., 2013; Bosch et al., 2008; Bergantinos et al., 2010). En esta región se produce un incremento continuo de la proliferación, que alcanza el máximo tres días después de la amputación y posterior trasplante. A partir de ese día la tasa de proliferación de las células

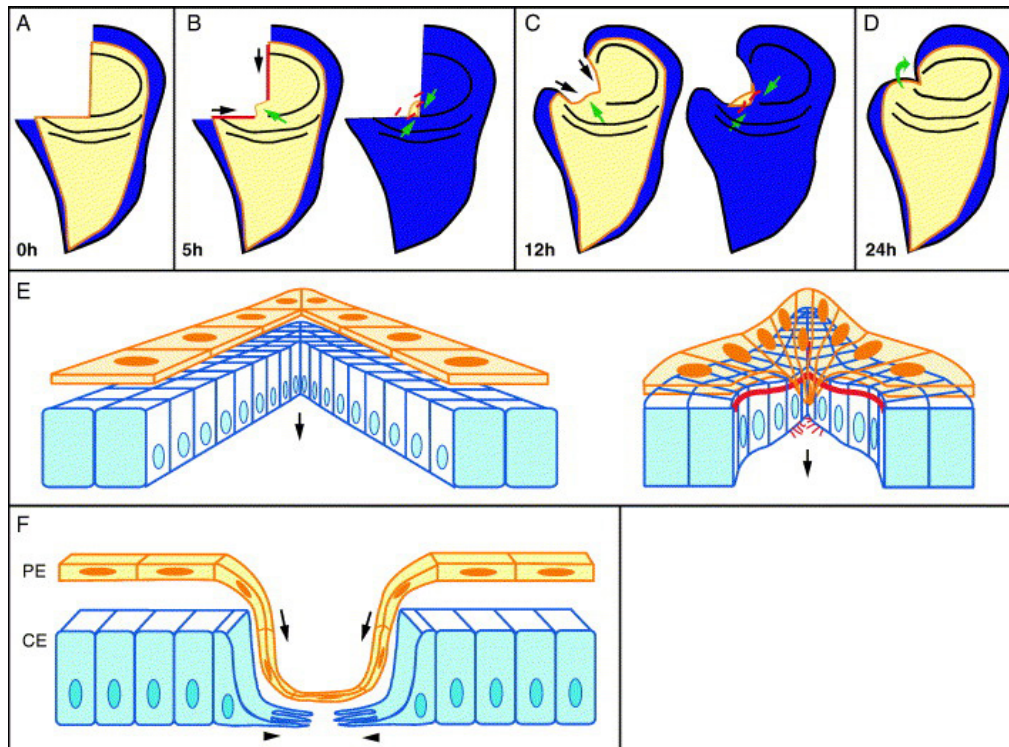


Figura 18. Modelo de la cicatrización de heridas en los discos imaginales. (A) vista esquemática de un fragmento de disco al que se le eliminó 3/4 del tejido tras la amputación. El EC se muestra en azul oscuro y el EP en color naranja. (B) 5 hs después del corte se forma un cable de actina en el borde del EP (líneas rojas, izquierda) que tira de los bordes de la herida (flechas negras) con el fin de reducir la superficie de la herida. Las células del EP se alargan hacia el vértice de la herida (flecha verde). A la derecha, observamos el EC. Las células del EC extienden filopodios (líneas rojas) para unir ambos lados de la herida. (C) 12hs después del corte se incrementa el número de células del EP que se alargan hacia el vértice (flecha verde) tirando de los bordes de la herida (flechas negras). A la derecha, observamos el EC. Las células de EP todavía cubren el vértice de la herida, mientras que los filopodios (líneas rojas) cierran la herida progresivamente como si fuera una cremallera (flechas verdes). (D) El EP del disco de ala 24 horas después del corte. La cicatrización de la herida se completa. Las células del EP cubren la región curada (flecha verde). (E) vista esquemática frontal del vértice de la herida poco después del corte (izquierda) y durante el proceso de cierre en cremallera (derecha). La herida se cierra (flechas negras) desde el interior (distal) hacia el exterior (proximal), debido a la contracción de la actina en apical (líneas rojas del EC) y a las extensiones filopodiales (líneas rojas finas basales). Las células del EP (naranja) ayudan a la cicatrización de la herida alargándose hacia esta y cubriendo el vértice. (F) Representación esquemática de una sección transversal en Z del vértice de la herida. El EP (naranja) se alarga hacia abajo cubriendo el vértice de la herida (flecha), mientras que las células del EC (azul) extienden filopodios de sus superficies baso-laterales (puntas de flecha) entretejiendo las células del EC de ambos lados de la herida (Modificado de Bosch M. et al; 2005).

del blastema va disminuyendo hasta que se iguala a la de los discos controles, lo que sucede aproximadamente siete días después de la amputación (Bosch, Baguna et al. 2008). Este proceso de proliferación se ha sugerido que es fundamental para completar la regeneración (Schubiger 1973).

Otras de las observaciones surgidas de estos experimentos indican que el resultado

final de la regeneración está determinado por la región amputada y el tamaño de ésta. Así, por ejemplo, amputaciones de una pequeña región periférica del disco tienen como resultado una regeneración completa del disco y una duplicación del pequeño fragmento eliminado (Bryant 1975) (Figura I 9). A partir de estos resultados se propuso que tras la amputación de una región del disco se daba lugar a la confrontación de dos regiones del disco con distintos valores posicionales. Este evento induciría un crecimiento intercalar que se detendría cuando todos los valores posicionales eliminados fueran completados y, por consiguiente, la región eliminada restaurada. Un proceso similar de crecimiento intercalar se había propuesto que ocurría durante la regeneración de las patas de anfibios y grillos (Bohn 1976). Basándose en estos estudios se propuso que la regeneración de las estructuras perdidas en *Drosophila* es el resultado de un crecimiento regenerativo siguiendo un modelo epimórfico (French et al. 1976; French 1981). Todos estos resultados condujeron a French y colaboradores a proponer el modelo de coordenadas polares. De acuerdo con este modelo, el crecimiento de los discos estaba determinado por dos valores: uno circular, que correspondía a la posición de las células alrededor de la parte más exterior de los discos, y otro radial que correspondía a la posición de las células en el eje próximo-distal. Cuando un fragmento de un disco es amputado se pondrían en contacto células que tendrían distintas coordenadas polares (valores posicionales). De manera, que cuando la diferencia entre estos valores no fuese muy grande se induciría un crecimiento intercalar que restauraría los valores eliminados, lo que llevaría a la regeneración completa del disco. Cuando la amputación diera lugar a la confrontación de regiones con valores posicionales muy diferentes, como ocurriría en los fragmentos pequeños resultantes después del corte, no se podrían restaurar todos los valores intermedios y el fragmento se duplicaría (Figura I 9).

Un modelo alternativo fue propuesto por Meinhardt (Meinhardt 1982). Como hemos descrito anteriormente los bordes de compartimentos ejercen como centros organizadores. De acuerdo con este último modelo, tras la amputación y cierre de la herida se confrontarían células de distintos compartimentos, lo que daría lugar a que se generaran nuevos bordes de compartimentos. Estos nuevos bordes, podrían organizar el crecimiento y la formación del patrón de los discos amputados, lo que permitiría la regeneración completa del fragmento eliminado.

Este modelo también explicaría algunos resultados obtenidos en experimentos de amputación y trasplantes de patas de grillos. En estos ensayos se describía que tras el trasplante de secciones de patas a patas anteriormente amputadas a distintos niveles, el proceso regenerativo daba lugar a patas con múltiples terminaciones. Este fenómeno ocurría cuando la sección trasplantada se implantaba con una orientación distinta a la del fragmento eliminado (Figura I 9). El modelo propuesto por Meinhardt (Meinhardt 1982) sugiere que esto

se debe a que la implantación del fragmento amputado generaría varias confrontaciones de células de distintos compartimentos, lo que tendría como resultado la formación de distintos bordes de compartimentos, que daría lugar a múltiples centros organizadores del crecimiento, que resultarían en patas con varias ramificaciones (Figura I 9).

Una de las desventajas del cultivo *in vivo* es que la regeneración no se produce en condiciones fisiológicas, ya que la extracción del disco y su trasplante en los adultos hospedadores provoca un estrés severo en los discos, que se refleja en la detención de la proliferación celular e inducción de muerte tras el trasplante (Bosch et al. 2008). Además, los sistemas traqueales que suministran oxígeno a los discos se deshacen durante el proceso de extracción de los discos, de manera que éstos crecen en condiciones de hipoxia, por lo que el proceso de regeneración no ocurre en condiciones fisiológicas normales. Por otro lado, en caso de querer estudiar las estructuras cuticulares adultas a las que estos discos amputados dan lugar, es necesario volver a transplantar el disco imaginal dentro de una larva, para que durante el proceso de metamorfosis éste diferencie junto con el resto de tejidos de la larva. El resultado es una bola de tejido cuticular desorganizado y difícil de analizar (Figura I 10).

6.2. Inducción de crecimiento regenerativo mediante la ablación genética de tejidos

Con el fin de evitar el tratamiento traumático que implica la técnica de trasplante, recientemente se ha desarrollado un sistema de ablación genética utilizando el sistema binario Gal4/UAS en combinación con Gal80^{ts}. Este método permite la inducción transitoria de muerte celular en dominios específicos de los discos durante un periodo de tiempo limitado, tras el cual los discos se recuperan (Smith-Bolton et al. 2009; Bergantinos et al. 2010). Utilizando este método se ha demostrado que, al igual que ocurría cuando se eliminaba quirúrgicamente un fragmento del disco, tras la ablación genética existe un incremento de la proliferación alrededor de la región eliminada. Además se observa que hay un incremento en la ruta de señalización c-Jun N-Terminal Kinasas (JNK) cerca del borde de la herida, de la que depende que se produzca una correcta cicatrización (Bosch et al. 2005; Mattila et al. 2005; Bosch et al. 2008). Por otro lado, algunos de estos trabajos indican que tras la inducción de la muerte se producía un aumento de la expresión de genes implicados en supervivencia y competición celular como *wg* y *Myc* (Smith-Bolton et al. 2009). En este trabajo se propone que el incremento de expresión de *wg* podría antagonizar las señales de diferenciación en las células del disco imaginal y permitiría la regeneración del tejido manteniendo la capacidad proliferativa de las células. Además, el incremento de expresión de *Myc* potenciaría el crecimiento regenerativo y podría estar relacionado con el papel de *Myc* promoviendo plasticidad celular (Smith-Bolton et al. 2009).

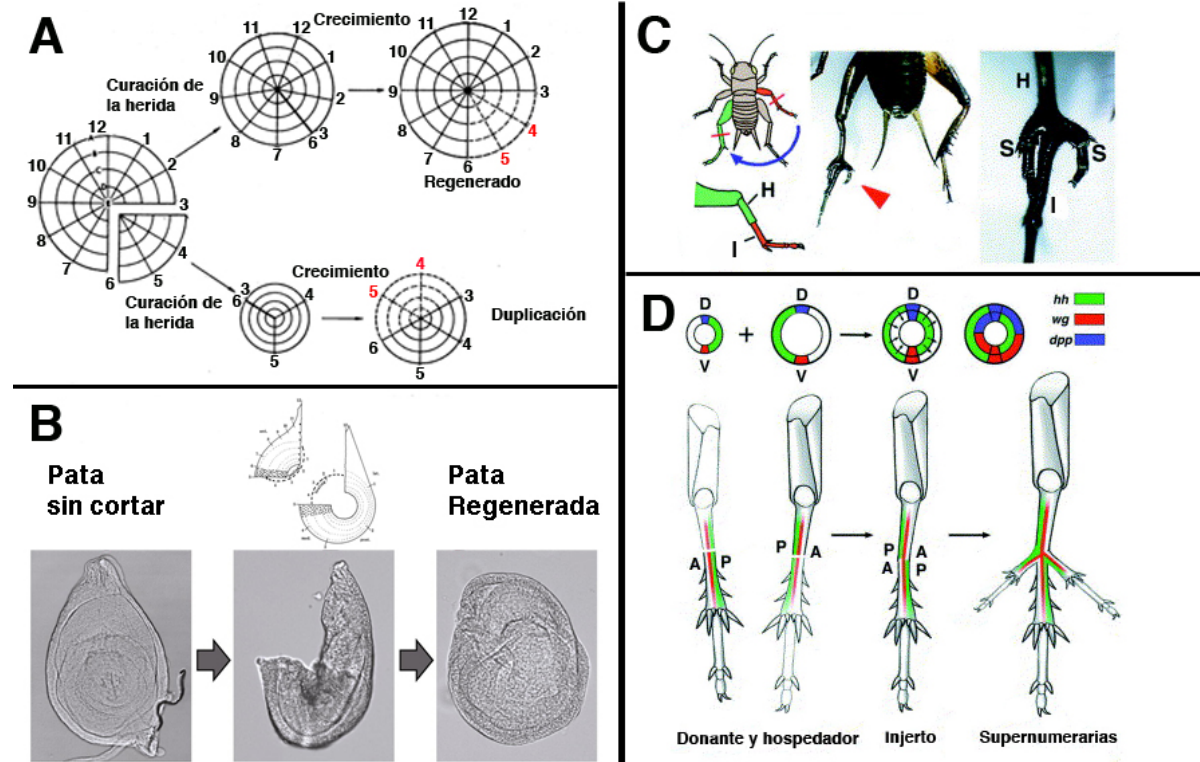


Figura 9. Ejemplos de los distintos modelos propuestos para la regeneración. (A) Modelo de coordenadas polares. Ejemplos de cómo se restablecerían los distintos valores posicionales siguiendo este modelo. (B) Disco de pata en distintas fases del proceso regenerativo. Arriba esquema de los distintos valores posicionales que se definirían de acuerdo con el modelo de coordenadas polares. (C) Formación de las patas supernumerarias por injerto de trozos de pata en ninfas de grillo y predicción de los patrones de expresión de Hedgehog (verde), Wg (rojo) y dpp (azul) durante la regeneración. Parte distal de la pata mesotorácica derecha (injerto: I) fue amputada e injertada en el muñón de la pata metatorácica izquierda (hospedadora: H) del grillo. Esta operación dio lugar a la inversión de la polaridad anteroposterior (A / P) del injerto en el hospedador, que condujo a la formación de dos patas supernumerarias (S), una de ellas esta indicada por la punta de flecha roja en el panel central y la otra por S en el panel de la derecha. (D) Predicción de los patrones de expresión de los tres genes hh (verde), Wg (rojo), y dpp (azul) durante la formación de las patas supernumerarias que se muestran en C. En la serie superior, el pequeño círculo de la izquierda y los círculos adyacentes más grandes, representan secciones transversales del injerto y el hospedador, respectivamente, donde se muestran los patrones de expresión de hh, Wg y dpp. Cuando se injerta el fragmento, la polaridad Antero-Posterior cambia, la expresión de hh tanto en el compartimento Posterior del injerto como en la pata hospedadora induce las expresiones de Wg y dpp en el lado ventral y el lado dorsal del compartimento anterior (círculos dobles). El sitio en el que las células que expresan Wg colindan con las células que expresan Dpp se convierte en centro organizador que induce la formación del eje proximodistal. A, anterior, P, posterior; D, dorsal; V, ventral. (Modificado de French 1976, Katsuyama 2011 y Taro Mito 2002).

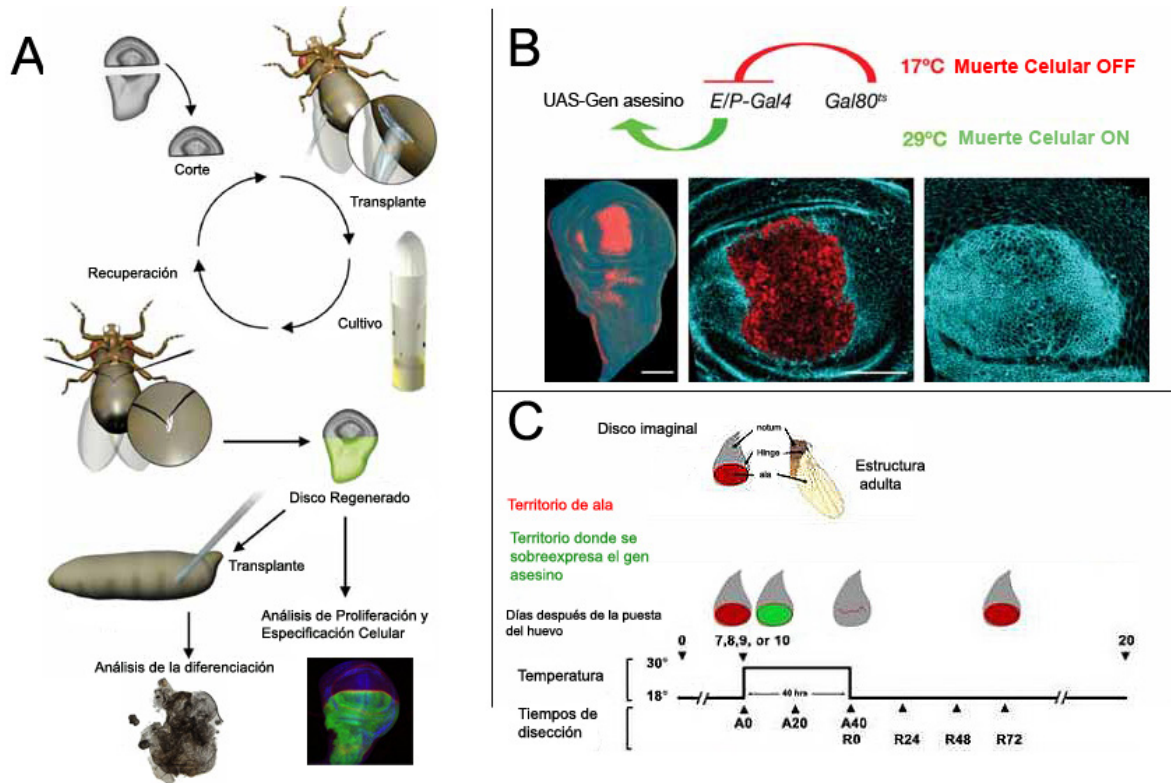


Figura I 10. Metodos clásicos y nuevos enfoques para el estudio de la regeneración.

(A) El método clásico para el estudio de la regeneración de los discos imaginales de *Drosophila* consiste en fragmentarlos quirúrgicamente. Los fragmentos se implantan en el abdomen de una mosca adulta hospedadora. Los discos regenerados se pueden recuperar de los hospedadores por microcirugía. Estos discos pueden ser analizados o bien fragmentados de nuevo e implantados otra vez. Para estudiar a qué dan lugar estos discos fragmentados, es necesario que sean trasplantados a larvas. Después de la metamorfosis, los discos se diferencian en estructuras adultas que pueden ser identificadas. (B) Eliminación genética de dominios específicos en los discos imaginales de *Drosophila*. La expresión del factor de transcripción Gal4 está bajo el control de un regulador específico de tejido. En esa zona, este factor se une a los sitios UAS y activa un gen pro-apoptótico o una toxina. Para evitar la muerte continua, se utiliza una forma termosensible del factor Gal80, que actúa como un inhibidor de Gal4. En la imagen se pueden observar un disco de ala en el que se activa el inductor de apoptosis, *reaper* (*rpr*) en el dominio *spalt*. El resultado de esta sobreexpresión es la inducción de muerte celular en el territorio *spalt* (marcada por caspasa-3 en rojo). (C) Esquema del procedimiento de ablación genética. Las larvas se cultivaron a 17°C con el fin de que crecieran normalmente. 7 días después de la puesta del huevo se transfieren a 29°C, momento en el que el gen inductor de muerte comienza a actuar y se produce la muerte celular por ablación (Modificado de Bergantiños et al, 2010; Repiso A. et al 2011 y Smith-Bolton 2009).

Experimentos recientes muestran que tras la inducción de la muerte celular, se produce un proceso mediante el cual células de áreas vecinas migran hacia el territorio dañado, siendo estas células capaces de reemplazar a las células muertas. Las células migratorias cambian su identidad original y adquieren la de las células a las que están reemplazando. Este proceso estaría acompañado por un incremento de la proliferación de forma

generalizada por todo el disco. Es decir, existe un potente mecanismo homeostático que es capaz de curar heridas que puedan surgir durante el desarrollo (Herrera S.C. et al., 2013).

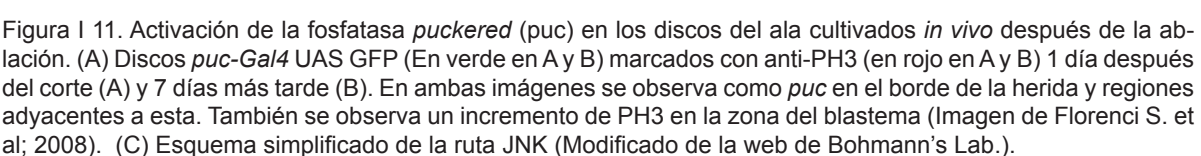
Una diferencia entre el método de ablación genética y el de la amputación quirúrgica es que la sobre-expresión del factor inductor de muerte celular no es suficiente para matar todas las células de la región específica, por lo que las células muertas siempre coexisten con las células vivas, permitiendo a estas últimas intercambiar señales durante este tiempo que promuevan proliferación celular compensatoria (Ryoo et al. 2004; Perez-Garijo et al. 2004). Además, la activación ectópica de vías de señalización para inducir apoptosis, podría promover diferentes respuestas celulares no asociadas con el proceso de regeneración de órganos, pudiendo perturbar así la recuperación normal y la regeneración de los discos. Estos ensayos sugirieron que la función del morfógeno Wnt / Wg y el oncogen Myc, están implicados en el proceso de regeneración (Smith-Bolton et al. 2009).

6.3 Genes requeridos durante la regeneración: Rutas de Señalización y su papel putativo en regeneración del disco de ala

Distintos trabajos han descrito rutas de señalización que son activadas durante el proceso de regeneración. La función de alguna de ellas parece ser crítica para inducir y completar la respuesta regenerativa.

6.3.1. La ruta de las *c-Jun* N-terminal kinasas

La actividad de esta ruta es requerida para múltiples funciones durante el desarrollo de *Drosophila*, tales como la respuesta a estrés celular, proliferación, apoptosis, respuestas inflamatorias, y morfogénesis de tejidos. Además, esta vía es necesaria en distintos procesos celulares durante el desarrollo como el cierre dorsal en el embrión, la evaginación de los discos (Pastor-Pareja et al. 2004; Martin-Blanco et al. 2000) y la fusión de los discos contralaterales durante la formación del tórax durante la metamorfosis. La activación de esta ruta depende del factor de necrosis tumoral (TNF), codificado en *Drosophila* por el gen *eiger* (Shlevkov 2012; Moreno et al. 2002; Igaki et al. 2002; Smith-Bolton et al. 2009). Este ligando inicia una cascada de activación de quinasas que termina con la fosforilación del homólogo de JNK codificado por el gen *basket* (*bsk*). Bsk, a su vez, fosforila y activa a los factores de transcripción Jun y Fos, que regulan la transcripción de genes diana (Davis, R. J. 1999). Uno de estos genes diana es *puckered* (*puc*), una fosfatasa de especificidad dual cuya expresión es inducida por la vía de JNK, y una de sus funciones consiste en autoregular negativamente



En definitiva, la activación de las JNK se produce en las células del blastema y puede ser considerada como una de las primeras señales activadas durante el proceso de regeneración.

6.3.2. Señalización de Wnt

La cascada de señalización Wnt desempeña un papel clave en muchos aspectos del desarrollo embrionario y está implicada en múltiples procesos celulares tanto en insectos como en vertebrados (Labus et al. 1998; Harden 2002; Zhang, Xiong et al. 2009). En la ruta de señalización de Wnt/b-catenina, las proteínas Wnt secretadas se unen a receptores de la superficie celular de la familia *Frizzled* (*Fz*) y activan *Dishevelled* (*Dsh*), que a su vez inhiben un complejo de proteínas que incluye axina, GSK-3 y APC (Logan et al., 2004; Widelitz et al., 2005; Clevers 2006). En ausencia de la señal Wnt/Wg, el complejo axin/GSK-3/APC fosforila b-catenina provocando su degradación citoplasmática, lo que hace que los genes que reponen a la vía de Wnt no sean transcritos (Harden 2002).

Se ha propuesto que la función de esta ruta juega un papel importante en la formación del blastema durante la regeneración de la aleta trasera y corazón adulto de pez cebra, así como las extremidades posteriores de los renacuajos de *Xenopus* (Lepilina et al. 2006). Además, su función es requerida durante la regeneración de la hidra (Hobmayer et al. 1996; Hobmayer et al. 2000).

En *Drosophila* se ha descrito que tras la amputación de un fragmento del disco de pata y su posterior trasplante, *wingless* (*wg*) se expresa ectópicamente (Schubiger et al. 2010).

En el disco de ala se ha observado que utilizando el sistema de ablación genética *wg* inicialmente se expresa de forma ectópica para, más tarde, transcurridas 48 horas de recuperación desaparecer. La expresión normal de *wg* en estos discos se restablece después de 72 h de crecimiento regenerativo. A partir de estos trabajos se ha sugerido que *wg* juega un papel importante durante la regeneración.

6.3.3. Señalización de la ruta de Notch

La vía de señalización Notch es esencial para determinar el destino celular y regular la formación del patrón durante las etapas embrionaria y adulta. Notch (N) es un receptor de membrana involucrado en múltiples procesos durante el desarrollo (Heitzler et al., 1991;

Artavanis-Tsakonas et al. 1995; Sainson et al. 2005). La interacción entre N y Delta (DI) conduce a la escisión del dominio intracelular de N (DIC), que se trasloca al núcleo para unirse a *Supresor of hairless* (*Su(H)*), que es un factor de transcripción que activa la transcripción de genes diana de esta ruta (Bray 2006).

En los discos imaginales de ala de *Drosophila*, el límite de los compartimientos D/V está marcado por una línea de actividad de Notch que se inicia por la aposición de las células ventrales que expresan Delta con células dorsales que expresan Fringe y Serrate (Panin et al. 1997). Los trabajos realizados usando el método de ablación genética, muestran que la actividad de N en el borde D/V es mantenida durante todo el período de crecimiento regenerativo. Debido a que la mayor parte del tejido de la zona central del tejido presuntivo de ala es extirpado en estos experimentos, se ha sugerido que la señalización por N en el borde D/V se restablece rápidamente después de la ablación por la aposición de las células dorsales con células ventrales (Smith-Bolton, Worley et al. 2009).

También se ha observado, que la ruta de N participa en la regeneración del corazón de pez cebra, la cola de *Xenopus*, el músculo en ratones y en la transdeterminación en discos imaginales de *Drosophila*.

6.3.4. Ruta de señalización de Janus kinasa-Señal transductora y activadora de la transcripción (JAK-STAT).

La vía de señalización JAK-STAT desempeña varias funciones importantes en el desarrollo del disco imaginal de ala (Hoffmann et al., 1999; Zeidler et al., 2000).

En *Drosophila* esta vía se activa por tres citoquinas (de la familia de las IL-6), con homología a interleucinas de humanos y que son codificadas por los genes *unpaired*, *unpaired 2* y *unpaired 3* (*upd*, *upd2* y *upd3*) (Agaisse, Petersen et al. 2003). Se ha comprobado que en discos imaginales de *Drosophila* que han sufrido daño tisular, formación de tumores o heridas, se induce la expresión local de estas tres citoquinas (Pastor-Pareja et al. 2008). Estas proteínas se unen a un receptor de tipo IL-6R, *domeless* (*dome*), que activa la quinasa Janus (Jak), que recibe el nombre de Hopscotch (*hop*), que a su vez fosforila al factor de transcripción STAT3-like (Stat92E), promoviendo su translocación al núcleo donde regula la expresión de numerosos genes.

En discos de ala parcialmente amputados se ha encontrado que se activa la expresión de los ligandos de esta ruta (Pastor-Pareja, Wu et al. 2008). Se desconoce la función de esta vía de señalización durante el proceso de regeneración (Figura I 12).

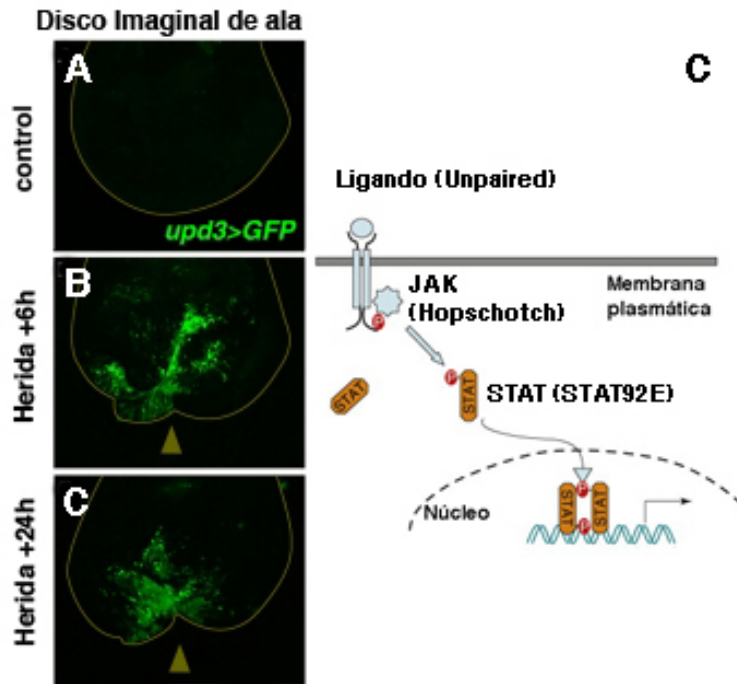


Figura I 12. Activación de las JAK-STAT en discos heridos. (A–C) Expresión de *upd3* (*upd3-Gal4>UAS-GFP*, verde) en los discos imaginales de ala. (A) Disco control, en el que no se produjo incisión. (B) Disco imaginal 6 horas después de producir una herida en él. Observamos la expresión de *upd3* en verde como se dispersa no solo por la herida sino en el área adyacente a ésta. (C) Disco imaginal 24 horas después de inducir la herida. La expresión de *upd3* continúa dispersa por el disco. La expresión de *upd3* se observa en verde. (Modificado de Pastor-Pareja et al; 2008). (D) Esquema simplificado de la ruta de las JAK-STAT (Modificado de Willis X. Li 2008).

6.3.5. Ruta de señalización de Hippo

La vía de señalización Hippo–Salvador y Warts (Hpo/Sav/Wts) está formada por un grupo de serina / treonina quinasas altamente conservadas que juega un papel fundamental en el control del tamaño de los órganos y la supresión tumoral mediante la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis (Staley and Irvine 2012).

La activación de esta ruta inicia una cascada de fosforilaciones en la que la quinasa Hippo (Hpo) fosforila a la proteína quinasa Warts (Wts). Una vez fosforilada Wts se activa y fosforila al regulador transcripcional Yorkie (Yki). La forma fosforilada de Yki se une a las proteínas 14-3-3 que impiden su traslocación al núcleo y active la expresión de varios genes que promueven el crecimiento e impiden muerte celular, tales como la ciclina E, y DIAP1 (inhibidor de la proteína apoptótica-1 de *Drosophila*). Yki por sí mismo es incapaz de unirse al ADN, de manera que para realizar su función se une al factor de transcripción *Scalloped* (Sd), formando el complejo Yki-Sd que puede traslocarse al núcleo y activar la transcripción de sus genes dianas. Yki también activa la expresión del microRNA *bantam*, un regulador positivo de crecimiento que afecta específicamente al número de células. Por lo tanto, la inactivación de Yki por Wts inhibe el crecimiento a través de la represión de la transcripción de varios reguladores positivos de crecimiento (Harvey and Hariharan 2012).

Utilizando sistemas genéticos que inducen ablación y regeneración en discos imaginales de ala, se ha observado que hay un aumento de expresión de los genes diana la ruta de Yki en las células del borde de la herida y las adyacentes a ésta. Otros estudios han demostrado que esta ruta es requerida durante el proceso de regeneración después de la ablación genética en los discos de ala (Sun and Irvine, 2011) estimulando la supervivencia de las células de alrededor y la división celular (Figura I 13).

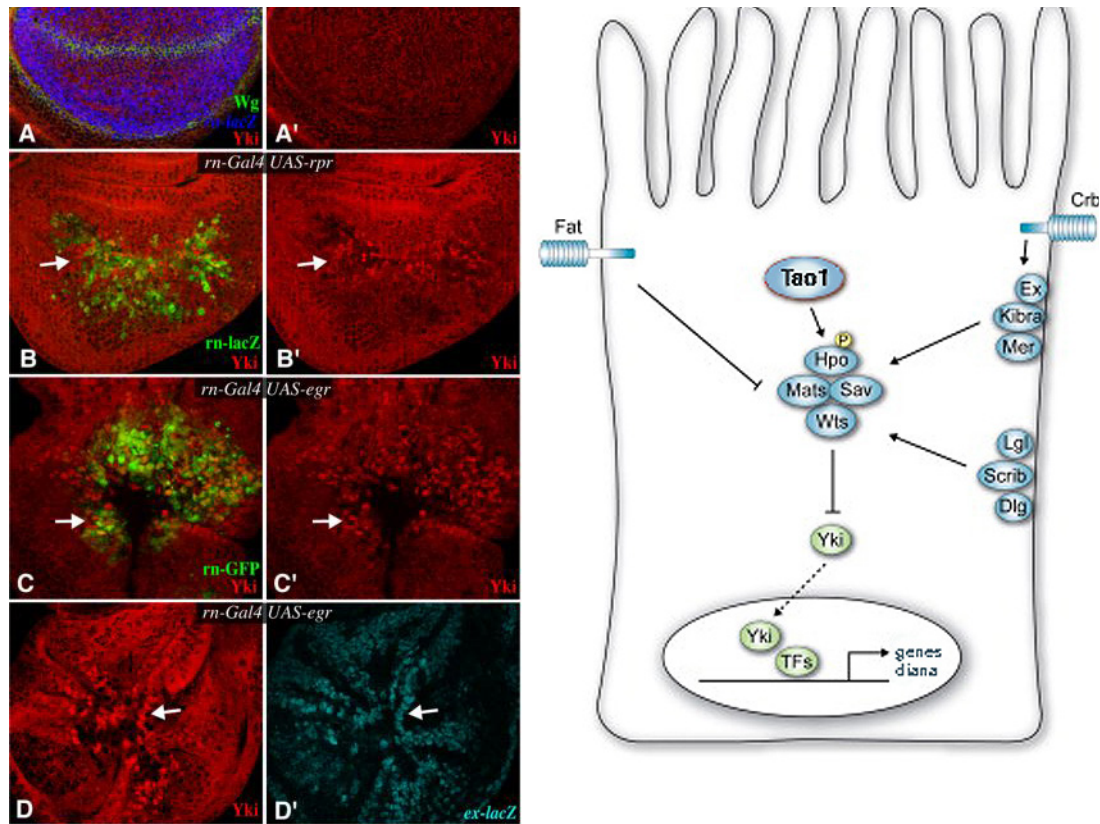


Figura I 13. Discos de ala de tercer estadio larvario *rn-Gal4 UAS-GFP, UAS-eiger*. Los discos están marcados con Yki en rojo. Yki nuclear se destaca por las flechas blancas. (A) Expresión de Yki en un disco imaginal control *rn-lacZ* (azul), Wg (verde) y Yki (rojo). (B) Disco *rn-Gal4 UAS-rpr; tubulina-Gal80ts UAS-lacZ*, 30 horas después de la inducción de Rpr. El dominio *rn* (anti-β-gal, verde) es pequeño e irregular, y se detecta Yki nuclear. (C) Discos *rn-Gal4 UAS-egr tubulina-Gal80ts UAS-GFP*, 30 horas después de la inducción de egr. El dominio *rn* (GFP, verde) es pequeño e irregular, y se detecta Yki nuclear. (D) Discos *rn-Gal4 UAS-egr tubulina-Gal80ts*, 30 horas después de la inducción de egr. Se incrementa la expresión del reportero *expanded-lacZ* (cian) en las células con Yki nuclear. (E) Esquema simplificado de la ruta. (Modificado de Irvine et al, 2011 y Carole L.C. Poon et al 2011).

6.3.6 Otras señales que son activadas durante la regeneración

Durante el proceso de cicatrización de una herida se requieren, además de las rutas ya mencionadas, vías de señalización y factores de transcripción adicionales. Se ha demostrado que los factores de transcripción *Fos* y *Grainy Head* (*Grh*) son requeridos para la curación y reparación de heridas tanto en la piel de mamíferos y como en la cutícula de *Drosophila* (Yates and Rayner 2002; Mehic, Bakiri et al. 2005; Gazel, Rosdy et al. 2008; Pearson, Juarez et al. 2009) (Pare, Kim et al.) (Figura I 14).

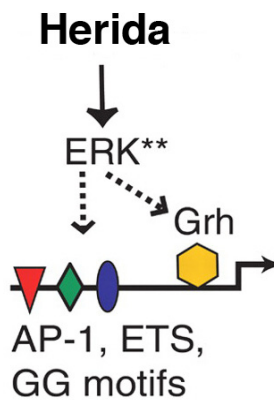


Figura I 14. La ruta de inducción de barrera epidermica para la reparación de está mediada por *grainy head* (*Grh*). La fosforilación de GrH por ERK es necesaria para la regeneración funcional de barrera de la epidermis después de inducir una herida. La conservación de esta vía *Grh*-dependiente sugiere que la reparación de la cutícula del insecto y de la piel de mamíferos esta controlado por un antiguo sistema conservado para la reconstrucción y curación de la barrera de la superficie corporal del animal (modificado McGinnis et al; 2005)

6.3.7 Epigenética en las heridas

Existe muchas evidencias que apoyan la idea de que las células puedan reprogramar sus perfiles de expresión génica durante la curación de heridas y la regeneración (Katsuyama and Paro). (Katsuyama and Paro 2011). En *Drosophila* se ha descrito un fenómeno asociado al proceso de la regeneración de los discos denominado transdeterminación. Este proceso ocurre cuando parte de las células regeneradas cambian su destino y diferencian como las de otro disco, por ejemplo, las células del disco de pata diferencian como ala (Shearn, Martin et al. 1984) (Maves and Schubiger 1995) (Maves and Schubiger 1998) (Lee, Maurange et al. 2005). Es decir, se produce una reprogramación de la identidad celular. Todo esto indica que durante la regeneración pueden activarse mecanismos que incrementen la plasticidad celular y que en ocasiones puedan dar lugar a reprogramación y cambios de identidad. En muchos casos este tipo de cambios están asociados a alteraciones epigenéticas, que alteran el programa de expresión génica.

Hasta el momento, se han descrito diferentes mecanismos epigenéticos, incluyendo distintos tipos de modificaciones de la cromatina y mecanismos basados en la unión a microRNAs (miRNAs) (Solter, Hiiragi et al. 2004). Los miRNAs están involucrados en el pro-

ceso de regeneración de la aleta de pez cebra (Yin and Poss 2008) y se han identificado en tejidos en regeneración de planarias (Gonzalez-Estevez and Salo 2010), tritones (Nakamura, Maki et al. 2010) e incluso ratas (Castro, Magre et al. 2012).

En *Drosophila* la identidad de cada disco está determinada por distintos factores, entre ellos la expresión diferencial de los genes homeóticos. El patrón de expresión de estos genes se establece en el embrión temprano por una cascada de activadores y represores transcripcionales. El mantenimiento de la identidad de los discos a lo largo del desarrollo está estrechamente asociada con el mantenimiento de los programas genéticos específicos de cada disco. Esto se logra principalmente por complejos de proteínas, tales como los genes del grupo Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG), que actúan como activadores y represores transcripcionales mediante la interacción y la modificación de la cromatina. El grupo de proteínas Polycomb (PcG) es una familia de modificadores epigenéticos muy conservada, que funcionan como represores transcripcionales por medio de modificaciones de las histonas (Sparmann and van Lohuizen 2006). Las proteínas de este grupo disminuyen su expresión durante la cicatrización de la herida, en áreas cercanas a ésta (Shaw and Martin 2009).

Estudios previos muestran que durante la regeneración, la expresión de los genes PcG disminuye como consecuencia de un incremento de la señalización de JNK (Lee, Maurange et al. 2005). El silenciamiento de PcG por parte de la ruta de la JNK está evolutivamente conservado y parece ser fundamental para el cambio de destino de la célula (Lee, Maurange et al. 2005).

Por otro lado, se ha descrito que las células que regeneran o transdeterminan en el blastema tienen un perfil del ciclo celular distinto al de las células normales de alrededor. Se ha propuesto que este cambio en la regulación del ciclo celular es un requisito previo para el cambio de destino de la célula. Entre los genes diana de PcG se incluyen genes implicados en la regulación del ciclo celular, lo que sugiere que este paso inicial podría estar mediado por cambios en la expresión de este grupo de proteínas.

Todos estos resultados sugieren que durante el proceso de regeneración, la disminución de la expresión de proteínas del grupo de PcG puede producir cambios en la estructura de la cromatina que incrementa la plasticidad celular.

6.4. Apoptosis

El número de células de los organismos pluricelulares está estrictamente regulado, no únicamente mediante el control de la tasa de división celular, sino también a través del control de la tasa de muerte celular. Existen mecanismos que permiten eliminar células a través de un proceso de muerte inducida por la activación de distintas rutas de señalización. A este proceso se le denominó muerte celular programada, o apoptosis (que en griego que significa “caerse”, como las hojas de un árbol). Estudios previos muestran claramente que la apoptosis está regulada genéticamente (Jacobson, Weil et al. 1997).

La apoptosis da lugar a un colapso de la célula, caracterizado por la formación de ampollas en la membrana, la contracción de la membrana celular, la condensación de la cromatina, y la fragmentación de ADN, seguido por una rápida expulsión del epitelio de la célula muerta por parte de las células vecinas. Se distingue de la muerte por necrosis por la ausencia de una respuesta inflamatoria asociada.

La apoptosis está implicada en diferentes procesos biológicos que van desde la embriogénesis al envejecimiento, y desde la homeostasis del tejido normal a muchas enfermedades humanas.

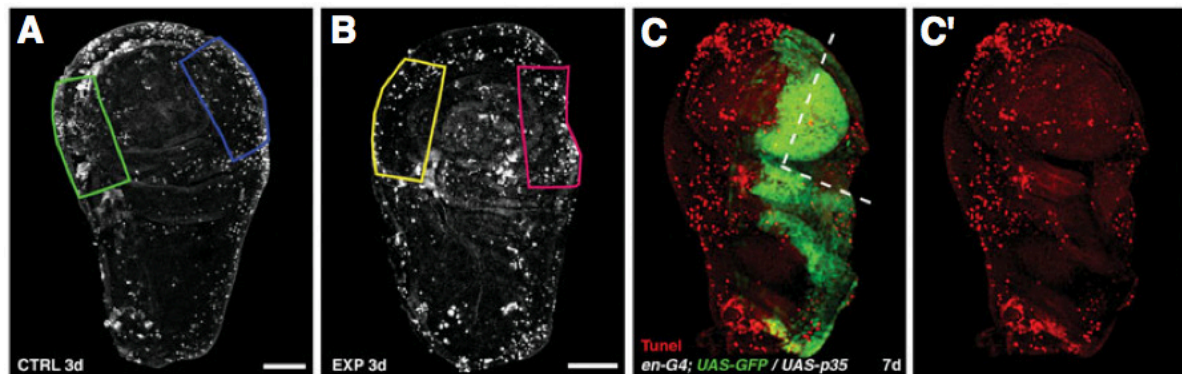


Figura I 15. Estudios previos analizaron el patrón de muerte celular con la tinción de TUNEL durante la regeneración de discos de ala cultivados en larvas (A, B) Discos de ala 3 días después de la implantación. (A) Tinción de TUNEL en un disco control. El recuadro verde señala la apoptosis que se produce en el compartimento Anterior (A) y el azul la apoptosis de compartimento Posterior (P). (B) Tinción de TUNEL en un disco de ala fragmentado, el recuadro amarillo indica la apoptosis en el compartimento Anterior y el rojo en el compartimento Posterior. En las imágenes se puede apreciar que no existe una gran diferencia en el número de células apoptóticas entre control y cortado. (C, C') Discos cortados después de 7 días de incubación en los que se sobreexpresó el factor inhibidor de apoptosis p35 en el compartimento posterior dirigido por *en-Gal4* (GFP, canal verde). La línea blanca discontinua marca el área regenerada aproximada. Las células muertas se muestran en rojo. A pesar de que la muerte celular se redujo drásticamente en el compartimento P (C'), la regeneración se produce con normalidad (Modificado del paper de Bosch M. et al; 2008).

Los estudios realizados en nemátodos (*C.elegans*), *Drosophila melanogaster* y ratón (*Mus musculus*) indican que la maquinaria molecular de la apoptosis está evolutivamente conservada y es intrínseca a todas las células de metazoos (Crawford, Seaman et al. 2012).

El proceso de inducción de la muerte se inicia por distintas señales tanto extracelulares como intracelulares que activan una cascada proteolítica mediada por las enzimas denominadas caspasas. Éstas existen en todas las células como precursores inactivos, o procaspasas, que por lo general se activan mediante escisión por otras caspasas, produciendo una cascada proteolítica. La activación de las caspasas está regulada por los miembros de la familia Bcl-2 y la familia de proteínas IAP.

Las proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas o IAP (inhibidor de las proteínas de apoptosis) son responsables de la regulación de las caspasas iniciadoras. Los IAPs (en *Drosophila* dIAP1 y dIAP2) son responsables de secuestrar las caspasas iniciadoras, bloqueando su capacidad catalítica. Mientras tanto, las proteínas apoptóticas de *Drosophila*: Reaper (Rpr), Head involution defective (Hid), Grim, Sickie y Jafrac2 a través de la unión a estos IAPs y por medio de su ubiquitinación (que conduce su degradación en el proteasoma) permiten la activación de las caspasas, activando de esta manera la apoptosis (White, Grether et al. 1994; Grether, Abrams et al. 1995) (Richardson and Kumar 2002; Bergmann, Yang et al. 2003).

Los estudios realizados analizando la función de la apoptosis durante la regeneración en discos transplantados no han sido muy concluyentes, debido a que la metodología utilizada induce un alto incremento en muerte celular. Así, la mera extracción de los discos da lugar a que se activen los procesos apoptóticos y se observe un gran número de células muriendo (Figura I 15). De manera que no se ha podido analizar si el proceso de regeneración induce muerte por si mismo. En estos estudios se ha observado que cuando la muerte celular es bloqueada durante la regeneración, ésta parece suceder con normalidad, lo que sugiere que la muerte celular no juega un papel muy importante durante el proceso regenerativo (Bosch, Baguna et al. 2008).

7. Desarrollo de un nuevo método para el análisis de regeneración *in situ*.

Las técnicas clásicamente utilizadas para analizar regeneración en discos imaginales han consistido en analizar los procesos regenerativos en discos cultivados *in vitro* o trasplantados a otros individuos. Estas técnicas son muy invasivas y además de alterar las condiciones normales que ocurren durante el desarrollo, no permiten el análisis detallado de las estructuras adultas tras la regeneración. Para poder analizar el proceso de regeneración de una forma más precisa y en condiciones fisiológicas normales, hemos desarrollado una técnica para eliminar fragmentos del disco de ala dentro de la larva. Este sistema, comparado con la técnica del trasplante, permite el estudio de la regeneración del disco en su contexto de desarrollo normal, y además es posible analizar las estructuras regeneradas en el individuo adulto. Por otro lado, dado que sólo eliminamos un fragmento del disco imaginal, los discos contralaterales pueden ser utilizados como control interno. Además, nuestra técnica permite el desarrollo de larvas y pupas, lo que hace posible estudiar el tamaño y el patrón de las estructuras adultas obtenidas tras el proceso de regeneración.

Con este método se puede estudiar de forma más eficaz los procesos genéticos y celulares que ocurren durante el proceso de regeneración.

El uso de este método, nos ha permitido abordar y revisar diferentes aspectos del proceso de regeneración que hasta el momento habían permanecido poco claros, tales como el papel de la proliferación celular durante las primeras etapas de la regeneración, la importancia de la muerte celular en este proceso, variaciones en la expresión de diferentes genes del patrón o el análisis de las estructuras adultas.

Objetivos

- 1) Desarrollo de nueva técnica que permita el estudio del proceso de regeneración en los discos imaginales de ala de *Drosophila* en condiciones fisiológicas.
- 2) Análisis de patrón y tamaño de alas adultas regeneradas en condiciones fisiológicas.
- 3) Caracterización del efecto de la herida en términos de división celular, muerte celular y cambios en la formación del patrón durante el proceso de regeneración.
- 4) Estudio del papel de Wg durante el proceso de regeneración.
- 5) Análisis de la remodelación de patrón durante la regeneración en ausencia de proliferación.
- 6) Análisis de cambios epigenéticos que ocurren durante la regeneración de los discos imaginales.
- 7) Estudio de los efectos de las diferentes vías de señalización que se activan en el borde de la herida e inducen y promueven la repuesta regenerativa.

Materiales y Métodos

1. Herramientas genéticas

1.1. Cultivo de *D. melanogaster*

Todas las estirpes y cruces se mantuvieron en cámaras de temperatura reguladas a 17°C, 25°C y 29°C, según el caso, y crecieron en un medio de cultivo estándar preparado a partir de harina, glucosa, agar, levadura y ácido propiónico.

1.2. Estirpes de *D. melanogaster*

1.2.1. Líneas *Gal4* y *UAS*

El sistema *Gal4/UAS* es un sistema de expresión génica de levaduras. Su uso en *D. melanogaster* permite la expresión dirigida de genes que estén bajo el control de secuencias *UAS* ("Up-stream Activating Sequence") (Brand y Perrimon, 1993). El activador transcripcional *Gal4* reconoce y se une a las secuencias *UAS* promoviendo la transcripción de cualquier gen X localizado en posición 3' a dichas secuencias (Figura M 1). La activación del gen *Gal4* está regulada por la región promotora de un gen endógeno, de forma que la expresión del *Gal4* reproducirá el patrón de expresión espacio- temporal de dicho gen.

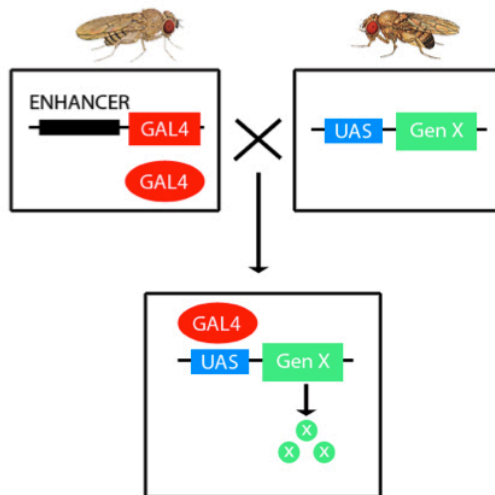


Figura M 1. Sistema de expresión génica *Gal4/UAS*. Cuando un individuo portador del transgén *UAS-genX* se cruza con otro portador del transgén *Gal4*, se genera una progenie portadora de ambos transgenes. La presencia de la proteína *Gal4* en un patrón determinado dirige la expresión de X con el mismo patrón (Modificada de la tesis de Javier Menéndez González).

1.2.2. Sistema *Gal4/ Gal80^{ts}*

Esta técnica es una variación del sistema *Gal4*, en el que se utiliza el factor *Gal80^{ts}* para controlar temporalmente la activación de los genes regulados por la secuencia *UAS*. La proteína *Gal80^{ts}* es un inhibidor del factor de transcripción *Gal4*, que cuando es expresado se une a la proteína *Gal4* e inhibe su función transcripcional. La actividad de *Gal80^{ts}* es sensible a la temperatura por lo que a 29 °C no es funcional. Por lo tanto, para activar y apagar los diferentes genes analizados mantuvimos las moscas *engrailed-Gal4 UAS-GFP*; *tubulina-Gal80^{ts} UAS-X* (donde X representa los diferentes genes analizados) a 18°C hasta el tercer estadio larvario, tras el cual las larvas se traspasaban a 29 °C durante 24 horas. El análisis de los discos después de 24 hs a 29 °C, fue lo que denominados R0. Después de ese tiempo, los cultivos se cambiaron a 25 °C para detener la expresión de los diferentes genes sobre-expresados, y analizar los disco 24 hs después de la inducción del gen (R24) y 48 hs más tarde (R48). En nuestros experimentos usamos la región promotora de *engrailed* (*en*) para dirigir la expresión de la proteína X en todas las células del compartimiento posterior, y de *patch* (*ptc*) para dirigirlo en una estrecha banda en el territorio del borde antero-posterior (A/P). El factor transcripcional *Gal-80^{ts}*, esta bajo la regulación de la *tubulina*, con el fin de que sea expresado en todas las células de la larva.

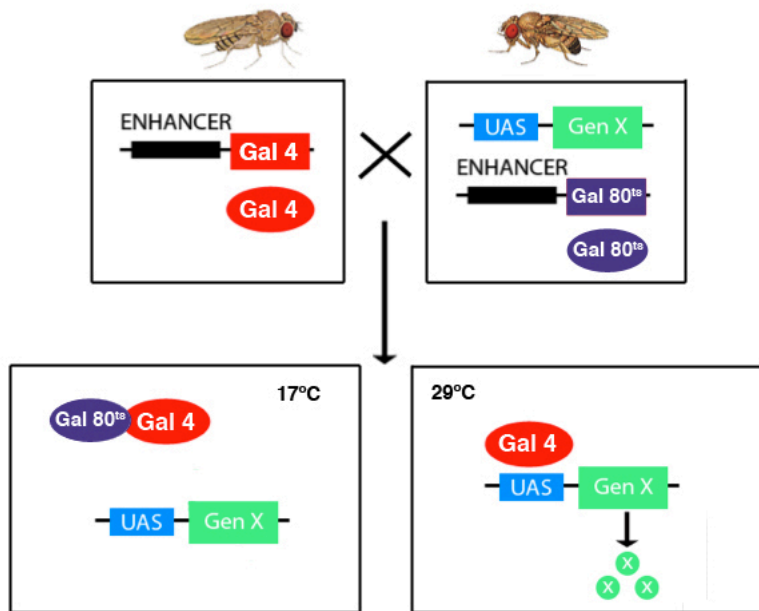


Figura M 2. Sistema de expresión génica *Gal4/UAS; Gal80^{ts}*. Cuando un individuo portador de los transgenes *UAS-genX tubulina-Gal80^{ts}*, se cruza con otro individuo portador del transgén *Gal4*, parte de la progenie será portadora de los tres transgenes. La presencia de la proteína *Gal80^{ts}* reprimirá la función del *Gal4* a 17 °C. Por el contrario, a 29 °C, la proteína *Gal80^{ts}* se inactiva, lo que permite la activación del *Gal4* que dirige la expresión del gen X en un patrón determinado. (Modificada de la tesis de Javier Menéndez González) .

1.2.3. Líneas utilizadas

Las líneas *Gal4* empleadas para dirigir la expresión génica fueron: *en-Gal4*, *zf-h2^{LP30}-Gal4* (Calleja, Moreno et al. 1996), *nubbin-Gal4*, *ap-Gal4* y *patch-Gal4*.

1.2.4. Líneas Lacz y reporteros

Para analizar el nivel de transcripción de diferentes genes, se utilizaron estirpes en las que se encontraba insertado el gen bacteriano *lacZ* en el locus de genes de interés. Estas estirpes son *diap1-lacz*, *puckered-lacz* (*puc-lacz* o *pucE69*), *wg-lacz* y *ap-lacz*.

La inserción marcadora de actividad transcripcional fue E(slp)mβ-CD2 (de Celis y cols., 1998) y el reportero *lacZ* en el siguiente stock: *w; If/Cyo Wg-lacz*

1.2.5. Líneas UAS

Las líneas *UAS* utilizadas han sido: *UAS-GFP*, *UAS-N^{intraLH50}*, *UAS-rux* (Thomas, Zavitz et al. 1997). Todas las líneas están descritas en FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). *w*; *UAS-RBF²⁸⁰*, *UAS-wg^{ARNi}*, *UAS-dIAP1*, *UAS-p35*, y para el análisis de activación ectópica de distintas rutas de señalización se llevo a cabo cruzando las siguientes líneas: *w*; *ptch-Gal4 UAS-GFP/CyO*; *tub Gal80^{ts}/ TM6b por*:

Vía de las JNK: *UAS-hep^{ca}* y *UAS-eiger*

Vía de las JAK-STAT: *UAS-upd*, *UAS-hop^{tum}*

Vía de HSW: *UAS-Yki*

La línea transgénica del *UAS-wg^{ARNi}* fue obtenida de VDRC (Vienna *Drosophila* Research Centre) (línea 39676).

El análisis de proliferación y expresión de marcadores de patrón se llevo a cabo cruzando las siguientes líneas: *w*; *en-Gal4 UAS-GFP/CyO* o *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO* por estirpes silvestres (Wt), *w*; *If/ Cyo wg-lacz*, y *w*; *E(spl)mβ-CD2/TM6b*.

El análisis del proceso de regeneración bloqueando la proliferación se llevo a cabo cruzando las siguientes líneas: *w*; *en-Gal4 UAS-GFP/CyO*; *tub-Gal80^{ts}/ TM6b por w*; *UAS-rux*, y *w*; *UAS-RBF²⁸⁰*.

El análisis de la ganancia de función de Notch fue llevado a cabo cruzando moscas: *w*; *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO* por *yw*; *UAS-N^{intraLH50}*.

Para eliminar la función de Wg, cruzamos *w*; *en-Gal4 UAS-GFP/CyO* por *UAS-wg^{AR-Ni}*

El análisis del proceso de regeneración bloqueando muerte celular se llevo a cabo cruzando moscas *w*; *en-Gal4 UAS-GFP/CyO* por *w*; *nub-Gal4, UAS-dIAP1* (Peterson y cols., 2003); *UAS-p35* (Hay y cols., 1994).

El análisis de la actividad de PcG se realizo cruzando *w*; *en-Gal 4 UAS-GFP/CyO* por *m-Gal4, UASGFP; pscQF QUASRFP*.

2. Método de ablación

La ablación quirúrgica se llevó a cabo en larvas *en-Gal4 UAS-GFP* o *zfh2-Gal4* durante el tercer estadio larvario (entre 96 y 144 horas después de la puesta del huevo (AEL). La expresión de *UAS-GFP* en el compartimento posterior o región proximal del ala, dirigida por *engrailed* o *zfh2^{LP30}* respectivamente, nos permite identificar los discos dentro de la larva mediante un microscopio binocular bajo luz UV.

La amputación del fragmento del disco se produjo mediante el cierre de un par de pinzas sobre el disco del ala sin romper la cutícula de la larva (vídeo 1) . Las larvas se mantuvieron en hielo durante este proceso. Con el fin de definir el tamaño del fragmento eliminado y la región de los discos amputadas, tomamos las imágenes de los discos, tanto cortados como controles con una cámara Leica DFC300Fx (Figura M3; M4). Después de este proceso, la larva continúa viva, por lo que puede proceder con su desarrollo normal. Esto nos permite analizar el proceso de regeneración horas después de infligir la herida en distintos momentos del desarrollo, y analizar las estructuras adultas a las que darán lugar (Figura R 1).

Los discos fueron disecados a: 0h, 4-6 hs, 18-20 hs, 48 hs después del corte (DC).

2.1. Cuantificación del tejido eliminado

Las imágenes de discos imaginales tanto cortados como contralaterales (controles) fueron tomadas en un microscopio confocal LSM510™ y se procesaron con el programa Image J. Para el cálculo del tejido eliminado en larvas *en-Gal4 UAS-GFP* se midió el área del compartimento posterior de los discos contra-laterales y el área del compartimento posterior restante en los discos cortados con el programa Adobe-Photoshop™ CS3. La cuantificación del tamaño de la región amputada se hizo comparando el área del compartimento posterior de los discos controles sin cortar (100%) con el área del remanente de tejido posterior tras la amputación en discos cortados. En el caso de las larvas *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP*, se midió el tamaño del territorio presuntivo del ala del disco control y se comparó con el del disco cortado 24 hs DC.

Las imágenes de las alas adultas se tomaron con una cámara Spot digital acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™. Para calcular el tamaño de las alas adultas se fotografiaron a un aumento de 5X, y se midió su área en píxeles con el programa Adobe-Photoshop™ CS3. La cuantificación de la reducción de tamaño se hizo comparando el área del ala control (100%) con el del ala regenerada.

Todos los datos fueron calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2008.

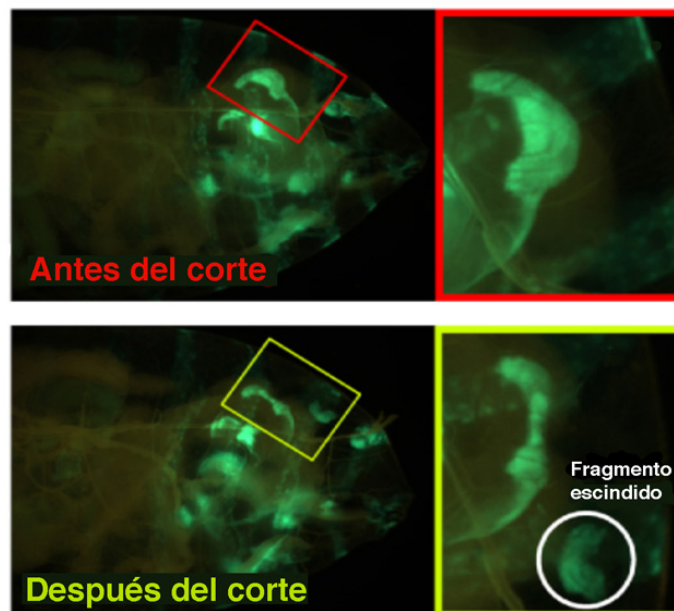


Figura M 3. Técnica de ablación quirúrgica in situ. En esta imagen se pueden observar los discos antes del corte (arriba) y después del corte (abajo), donde encontramos el disco cortado con el fragmento escindido totalmente.

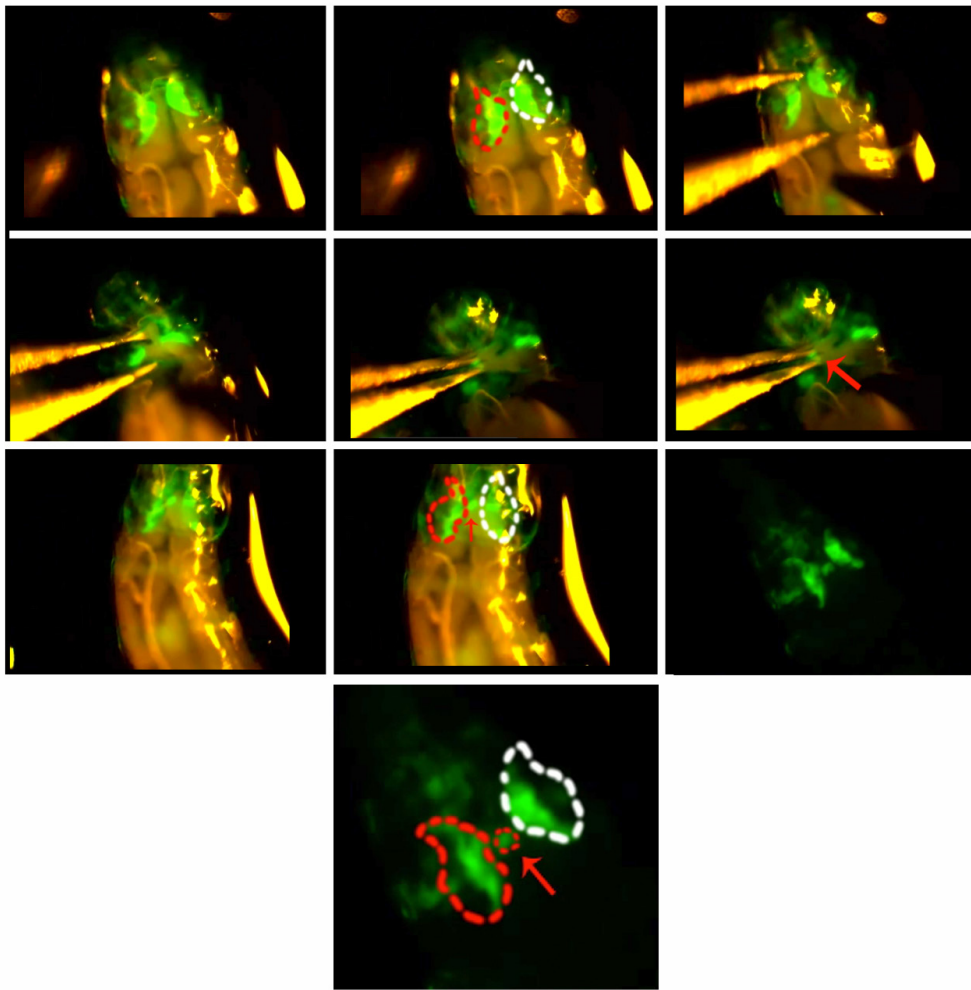


Figura M 4. Secuencia de imágenes de cómo se procede a efectuar el corte dentro de la larva.

3. Métodos Histoquímicos

3.1. Tinción Inmunohistoquímica.

Las tinciones con anticuerpos específicos de discos imaginales se realizaron como se describe en Cubas y cols., (1991).

Las larvas se diseccionaron en PBS en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se fijaron durante 30 minutos en paraformaldehído al 4% con 0,1% de DOC y Tritón X-100. Después se realizaron 3 lavados con PBT (PBS con 0,3% de Tritón X-100) al 1% de Albúmina de Suero Bovina (BSA). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante

una hora y media a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con PBT al 1% de BSA. Los discos se montaron en Vectashield (Vector Laboratories™).

Los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforo fueron Alexa Fluor 488, 555 y 647 de Molecular Probes. En algunos casos, simultáneamente a la incubación con los anticuerpos secundarios se incubó con Faloidina conjugada con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, Sigma, 1:200) para visualizar la actina cortical.

Los discos imaginales en los que se realizaron tinciones inmunohistoquímicas se prepararon en el medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories™).

Los anticuerpos secundarios (Molecular Probes) fueron usados a una dilución 1:200.

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Referencia
Anti-Wg	Ratón	1:50	DSHB
Anti-cas3	Conejo	1:200	Cell Signaling
Anti-PH3	Conejo	1:500	Upstate Biotechnology
Anti-DI	Ratón	1:100	DSHB
Anti-Bs	Cobaya	1:10	Cedido por M Affolter
Anti-CD2	Ratón	1:100	Serotech mouse anti-b-galactosidase (Promega Z3778A)
Anti-Iro	Rata	1:50	Cedido por Sonsoles Campuzano (Gomez-Skarmeta, 1996)
Anti-Ss	Cobaya	1:1000	(Nolo, 2000)
Anti-Hth	Cobaya	1:100	(Casares, 1998)

Tabla M1. Lista de anticuerpos primarios utilizados.

4. Métodos de microscopía y procesamiento de imágenes

4.1. Microscopía óptica

Las imágenes se tomaron con una cámara Spot digital acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™ o con una cámara digital Leica DFC300Fx acoplada a una lupa binocular Leica MZFLIII.

4.2. Microscopía confocal

Se utilizaron los equipos del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”: Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas en un microscopio confocal LSM510™.

4.3. Procesado de imágenes

El posterior procesamiento de las imágenes se realizó con los programas Zeiss LSM Image Browser 3.5, Metaview™ (Meta Imaging Corporation Plus), Adobe Photoshop™ CS3 e ImageJ 1.46.

5. Cálculo del índice mitótico en discos imaginales

El índice mitótico se calculó como el valor medio de la relación entre el número de células en mitosis en los compartimentos posterior y anterior, detectados por la expresión de Fosfo-Histona3 (PH3), y el tamaño del área del compartimento en píxeles (PH3-positivo células / tamaño del compartimento) de la parte anterior (control) y el área que quedaba del compartimento posterior después de la amputación. Por lo tanto los resultados están normalizados. Para el cálculo del tamaño del área sólo se consideraron la región presuntiva de ala, que está delimitada por la axila. Las imágenes utilizadas para realizar este análisis fueron proyecciones de 20 planos focales de un mismo disco. Se utilizaron un mínimo de 4 discos por genotipo estudiado.

6. Análisis estadístico

Se analizaron al menos 4 alas de hembras de cada genotipo o discos imaginales de ala. Los datos de tamaño del ala, tamaño del disco imaginal, tamaño celular y número de células en división se expresan como la media \pm la desviación estándar de la media

(+/-SEM) y fueron comparados usando una prueba de *t-student* no pareada de 2 colas. Se considera significativo un “p-value” menor que 0.005. Todos los datos fueron almacenados y calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2008.

7. Preparación de alas adultas y cuantificación del tamaño del ala

Las preparaciones de alas adultas se realizaron en un medio de montaje compuesto por ácido láctico/etanol (6:5). Las imágenes se captaron con una cámara digital Spot acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™. Para calcular el tamaño de las alas adultas, las fotos fueron tomadas a un aumento de 5X, y se midió su área en píxeles con el programa Adobe-Photoshop™ CS3.

8. Realización de la RT-PCR cuantitativa

Para determinar las diferencias de expresión de distintos marcadores de patrón y proteínas de los grupos PcG y Trx recurrimos a la extracción del ARNm, de discos imaginales de ala cortados y contra-laterales, y a la retrotranscripción de los distintos mensajeros de los genes a estudio mediante el empleo de unos cebadores comunes a todos ellos.

8.1 Preparación de la muestra y extracción de ARN:

Los discos fueron cortados y extraídos de la larva 20-24hr después y mezclados en un volumen apropiado de 300 microlitros de TRIzol. Las muestras fueron mantenidas en hielo durante todo el proceso. Cada ensayo se llevó a cabo con 60 discos de ala cortados 24 hs DC y los 60 discos imaginales de ala contra-laterales. Este experimento se realizó por triplicado.

La extracción de ARNm de los discos cortados y controles, y la RT-PCR, fue realizada por la Dra. Inmaculada González en el Institut de Génétique Humaine, CNRS; *Montpellier*, France.

8.2 RT-PCR cuantitativa

El ARNm de los discos de interés, se extrajo mediante su homogenización en 300 µl

de TRIzol (Invitrogen).

Para la retrotranscripción fueron usados 300-400 ng de ARNm total. La retrotranscripción se realizó con el kit de síntesis “Superscript III First Strand” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los cebadores oligo-dT. La cuantificación de cDNA se realizó por PCR a tiempo real, utilizando el kit “Roche Light Cycler” y el kit “Light Cycler FastStart DNA Master SYBR green I” (Roche). Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a Rp49.

9. Vídeos *in vivo*

Se procedió realizando un corte del compartimento posterior del disco de ala de una larva que expresa GFP bajo el patron de expresión de *blistered*. Transcurrida una hora los discos se extrajeron de la larva para ponerlos en medio de cultivo en una placa p-24 con fondo de vidrio. El medio de cultivo se preparo según el protocolo de Aldaz S. et al, 2010 (Aldaz, Escudero et al.).

El vídeo se realizó tomando imágenes de 15 secciones, de forma que englobara todo el grosor del disco, cada 20 minutos durante 12 horas en el Confocal LSM510 Invertido. Las imágenes fueron procesadas con el programa Image J.

Resultados

1. Caracterización del método de ablación *in situ* de un fragmento del disco imaginal de ala

Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar el proceso de regeneración en condiciones fisiológicas. Para ello hemos desarrollado una técnica que nos permite cortar una sección de un disco imaginal de ala *in situ*. El método que utilizamos consiste en pellizcar un fragmento de un disco de ala de tercer estadio larvario utilizando unas pinzas. Este procedimiento lo realizamos sobre la cutícula larvaria sin llegar a romperla (Figura M 3, Figura M 4 y Vídeo 1, ver M&M). De esta forma, la lesión se limita a un órgano no vital y la larva sigue con vida, lo que permite que el proceso de regeneración ocurra en condiciones fisiológicas normales. Además, dado que sólo amputamos uno de los dos discos, podemos utilizar el disco contra-lateral como control interno. Por otro lado, como las larvas pueden completar el desarrollo, los discos diferencian y evaginan con normalidad, lo que nos permite analizar el tamaño y el patrón de los órganos adultos tras el proceso de regeneración.

La amputación se realiza durante el tercer estadio larvario, entre 96 y 144 horas después de la puesta del huevo (AEL) en larvas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* (en las que está marcado el compartimiento posterior con la proteína verde fluorescente GFP) o *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP* (en las que se marca la región proximal del disco) (Figura R1). Utilizando el método anteriormente descrito y en el intervalo de tiempo indicado, encontramos alas adultas normales que derivan de discos a los que habíamos eliminado un fragmento, lo que

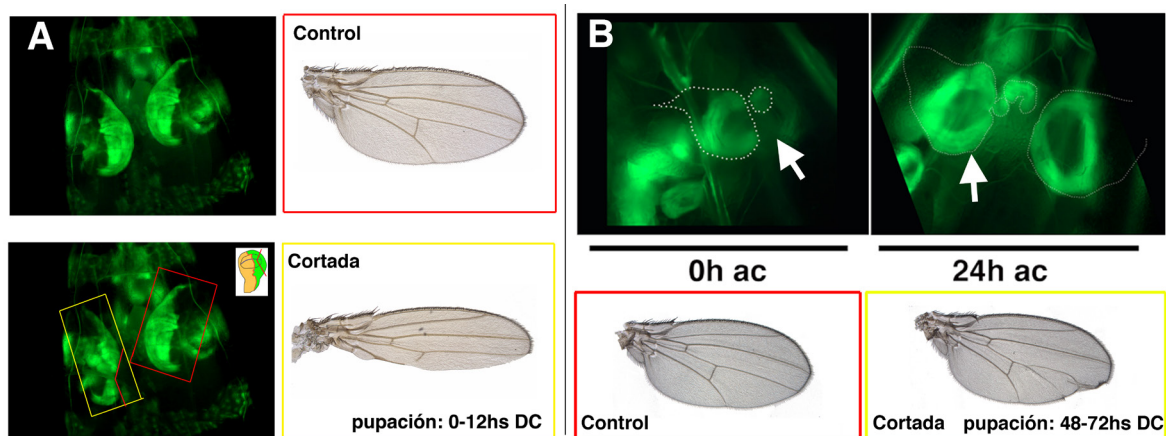


Figura R 1. Foto de los discos imaginales dentro de la larva en el momento del corte e imagen de las estructuras diferenciadas a las que da lugar y análisis de los discos imaginales 20 hs después de la amputación (DC). (A) Discos imaginales de ala de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP*, antes del corte (arriba) y justo después del corte (abajo). El compartimento posterior de los discos de ala aparece marcado en verde. A su derecha se encuentran el ala control a la que dará lugar el disco contra-lateral (recuadro rojo) y el cortado (recuadro amarillo). (B) Imagen de un disco de genotipo *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP* justo después del corte (izquierda) y 24 horas más tarde (derecha) (la flecha indica el disco en proceso de regeneración). Debajo de los discos encontramos las alas adultas derivadas de los discos controles y amputados.

indica que la respuesta regenerativa inducida y las condiciones utilizadas en nuestro ensayo permiten que los discos amputados puedan completar el proceso regenerativo (Figura R 1).

Utilizando esta técnica hemos analizado distintos aspectos acerca de cómo sucede la regeneración de los discos imaginales de ala. Por un lado, estudiamos si la respuesta regenerativa variaba dependiendo de la región del disco de ala amputada y/o de la cantidad de tejido eliminado. Para ello, realizamos cortes que eliminaban un fragmento que incluía parte del compartimento anterior y posterior del disco o cortes que eliminaban secciones de distinto tamaño de uno de los compartimentos. En todos los casos cuantificamos la cantidad de tejido eliminado (véase M&M). Por otro lado, examinamos si la capacidad regenerativa de los discos se alteraba durante el desarrollo. Para ello, amputamos discos de larvas a distintas edades tras la puesta del huevo, que también fueron datadas con respecto al tiempo transcurrido entre el momento del corte y la formación del pupario (Figura R 2).

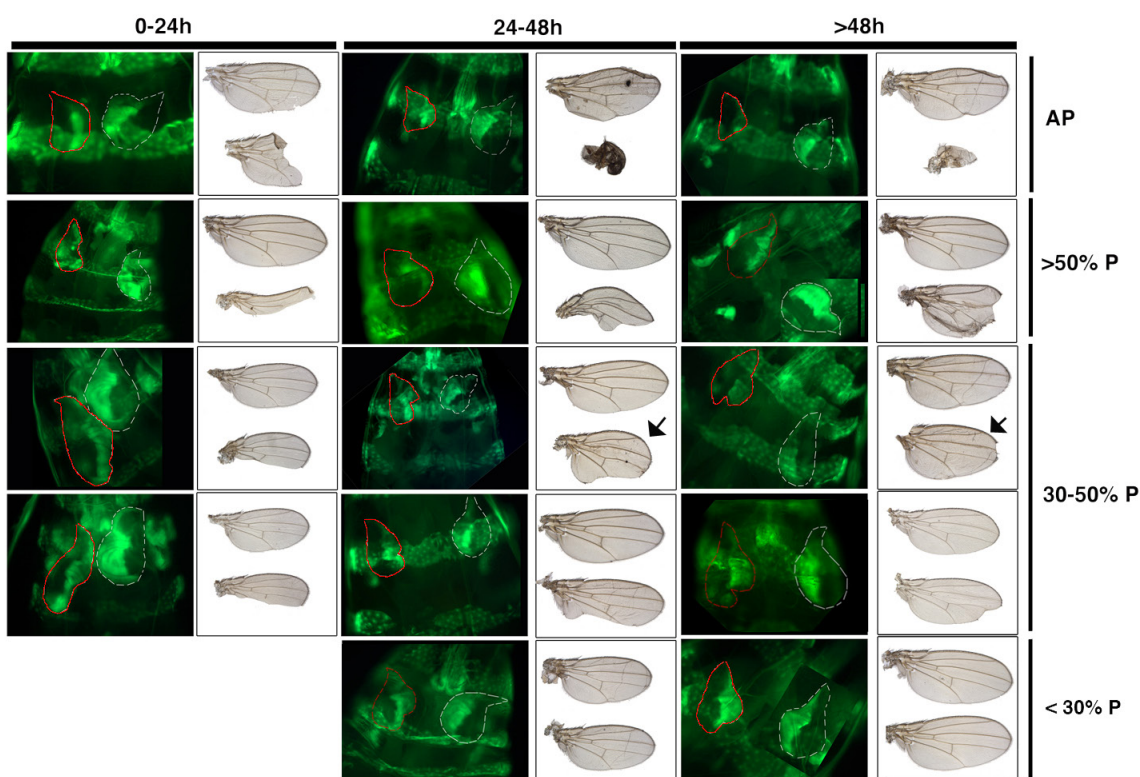


Figura R 2. Alas adultas regeneradas según el corte infligido. El eje X representa las horas transcurridas entre el momento del corte y la formación del pupario. Dividimos las alas en tres grupos, de 0-24h DC, 24-48h DC y 48-72h DC. En el eje vertical están representados los porcentajes de tejido de disco eliminado, que se correlaciona con las diferentes categorías identificadas, de arriba a abajo: muñón (cuando el fragmento eliminado contiene parte del compartimento anterior y posterior), muescas en anterior-posterior (cuando el corte afecta alrededor del 50% del compartimento P), tamaño (alas más pequeñas pero con un patrón normal), muescas en posterior (cuando el fragmento eliminado es entre un 30-50% del compartimento P) y finalmente alas normales, regeneradas completamente en los periodos de tiempo comprendidos entre 24-48 hs y 48-72 hs, lo que indica que el proceso de regeneración se ha completado. A la izquierda de cada una de las alas adultas puede observarse una imagen de la larva de la que procede el ala mostrada, justo después de realizar el corte.

Considerando estas variables analizamos las alas adultas resultantes del proceso de regeneración. En todos los casos, estas alas se compararon con el ala contra-lateral (control) para analizar las posibles diferencias en el tamaño o el patrón del ala, como resultado del proceso de regeneración (Figura R 2).

Cuando amputamos discos de ala de larvas relativamente jóvenes, a las 120 hs AEL (48-72 hs antes de la formación pupario (BPF)) observamos que, cuando seccionábamos un fragmento de los discos que ocupaba menos del 30% del compartimento posterior (P) todas las alas adultas derivadas de estos discos, o bien completaban el proceso de regeneración (72% de alas adultas eran completamente normales, $n=7$), o mostraban pequeñas muescas en el compartimento posterior, si bien el tamaño total del ala no se vió apenas afectado, observándose una reducción de un 1-2% respecto del ala control (Figura R 2 y R 3). Las alas adultas desarrolladas a partir de discos en los que eliminamos un fragmento de entre 30% y 50% del compartimento P, mostraron muescas en este compartimento en un 42% de los casos ($n=7$) o resultaron ser más pequeñas que las alas control. El patrón de venas de estas alas no se vió afectado en la mayoría de los casos, salvo algunos en los que se observó una pérdida de pequeños intervalos de venas. Cuando el fragmento eliminado es mayor y afecta a más del 50-60% del compartimento P, o al compartimento P y al A en gran medida, estos discos diferencian alas con muescas en ambos compartimentos o en alas vestigiales (que denominamos muñones) (Figura R 2 y R 3).

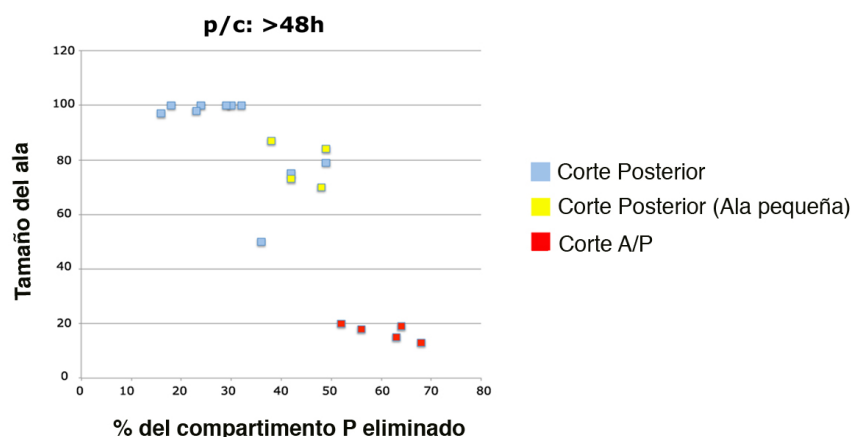


Figura R 3. Representación gráfica del tamaño del ala adulta con respecto al % del compartimento P eliminado en larvas de tercer estadio larvario tempranas - 120 hs AEL (48-72 hs antes de la formación pupario). p/c: pupación con respecto al corte. A/P: Antero-Posterior.

Encontramos resultados similares cuando los discos del ala son seccionados más tarde en el desarrollo (120-140 hs AEL, 24-48 hs BPF). Así, observamos que la mayor parte de las alas adultas (67%, n=12) que derivan de los discos en los que se amputaron fragmentos menores del 30% del compartimento de P, eran idénticas a las controles o mostraban pequeñas muescas en el compartimento posterior (Figura R 2 y R 4). Como describimos en el apartado anterior, las alas adultas diferenciadas de discos en los que se eliminó un fragmento de entre el 30-50% del compartimento P eran, o bien más pequeñas que las controles pero con un patrón de venas normal (18% n = 11), o bien contenían muescas en la parte posterior del ala. Cuando eliminamos fragmentos mayores del 50% del compartimento, siempre observábamos alas adultas vestigiales o alas muy pequeñas. Cuando seccionamos gran parte de ambos compartimentos, los discos amputados siempre diferenciaban en alas vestigiales (Figura R 2 y R 4).

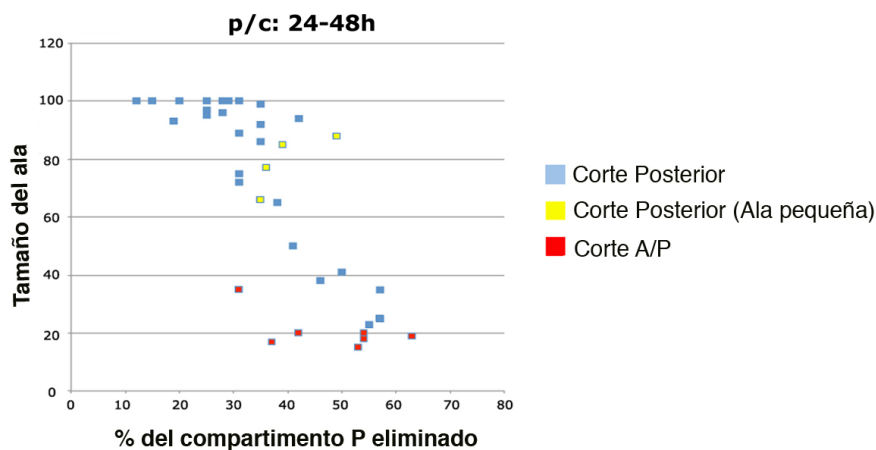


Figura R 4. Representación gráfica del tamaño del ala adulta con respecto al % del compartimento P eliminado en larvas de tercer estadio larvario 120-140 h AEL (24-48 h antes de la formación pupario, BFP). p/c: pupación con respecto al corte. A/P: Antero-Posterior.

Cuando la ablación se indujo más tarde en el desarrollo (140-160 horas AEL, 0-24 h, BPF) encontramos resultados distintos a los observados en etapas más tempranas, ya que el 90% de las alas que derivaron a partir de discos en los que había sido eliminado un fragmento menor del 30% del compartimento P, dieron lugar a alas adultas que mostraron muescas en el compartimento posterior. Cuando la región eliminada comprendía entre el 30-50% del compartimento P, las alas adultas siempre mostraban grandes muescas, que podían afectar a ambos compartimentos (Figura R 2 y R 5). Por último, las alas obtenidas de discos en los que se eliminaron secciones más grandes, en los que se ablacionó un 50-60% del compartimento P o grandes secciones de ambos compartimentos, mostraron grandes muescas que afectaban a ambos compartimentos en el ala adulta o resultaron en alas vesti-

giales. En este intervalo de tiempo, nunca encontramos alas mas pequeñas con patrón normal. Estos resultados sugieren que hay una pérdida de la capacidad regenerativa al final del tercer estadio larvario o durante el desarrollo pupal, como había sido descrito anteriormente por Halme *et al*, 2010 (Figura R 2 y R 5).

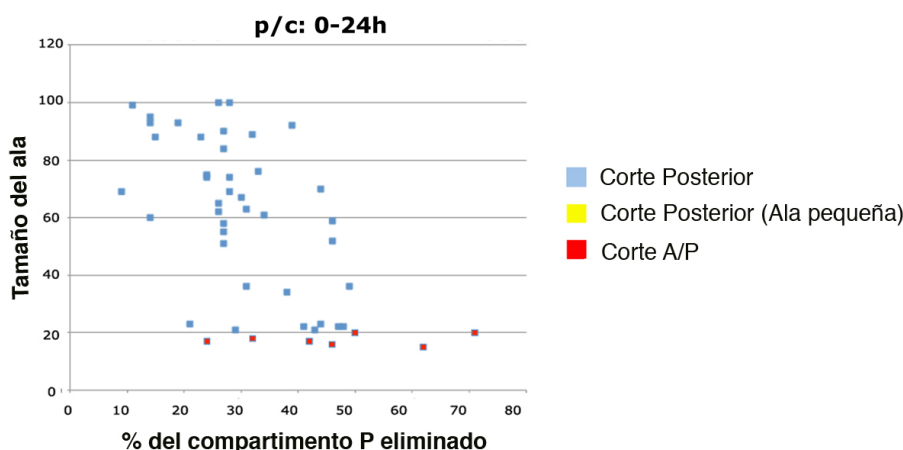


Figura R 5. Representación gráfica del tamaño del ala adulta con respecto al % del compartimento P eliminado en larvas de tercer estadio larvario tardío – 140-160 hs AEL (0-24 hs antes de la formación pupario, BFP). p/c: pupación con respecto al corte. A/P: Antero-Posterior.

En resumen, todos estos resultados sugieren que tanto la edad de la larva así como el tiempo transcurrido entre el momento en que se inflige el corte y la formación de pupario son esenciales para que se complete el proceso de regeneración. Así, en nuestras condiciones experimentales, la regeneración sólo se puede completar cuando la amputación se realiza en larvas más jóvenes de 144 hs AEL y nunca más tarde de 24 horas antes de la formación del pupario. Por otro lado, nuestros datos indican que existe una buena correlación entre la cantidad del tejido extirpado en el disco y el fenotipo del ala adulta regenerada (Figura R 2). Así, si el fragmento eliminado es menor del 30% del compartimento P, la regeneración puede completarse, mientras que esto no sucede cuando la sección eliminada es de entre el 30-50% del compartimento P. En este último caso, encontramos que la mayoría de las alas adultas que derivaron de estos discos, mostraban muescas en uno o ambos compartimentos y las alas eran más pequeñas que las controles, indicando que la regeneración no se completó. Una categoría de ala que resultó especialmente interesante son aquellas alas más pequeñas que los controles, pero que presentaban un patrón de venas normal. Este resultado podría sugerir la existencia de un mecanismo de reorganización del tejido y del patrón durante el proceso de regeneración del disco de ala.

Por último, nuestros datos indican que los discos en los que se eliminaron grandes regiones que afectaban a ambos compartimentos (anterior y posterior), o en los que el frag-

mento eliminado era mayor del 50% del compartimento P, la regeneración no tiene lugar o es mínima (Figura R 2).

2. Caracterización del patrón de división celular en discos imaginales de ala regenerados

Diversos estudios han indicado que durante la regeneración de los discos se produce un incremento de la proliferación (Bosch, Baguna et al. 2008). Utilizando el método descrito en el apartado anterior, analizamos el patrón espacial y temporal de la división celular en discos de ala en regeneración. Para ello, examinamos la expresión del marcador mitótico Fosfo-Histona 3 (PH3) a diferentes tiempos después de realizar el corte (DC). Calculamos la densidad mitótica en cada compartimento como el número de células PH3 positivas dividida por área del compartimento (medido en píxeles). Para definir el tamaño del compartimento sólo consideramos los territorios putativos de ala y el territorio de la axila del disco del ala, delimitados por la expresión de *wg*. Entre las 4-10 hs DC ($n=13$ y $n=8$, respectivamente) sólo se observó un ligero incremento de la densidad mitótica en ambos compartimentos, anterior y posterior, en comparación con la de los discos contra-laterales (Figura R 6 B-C'). Sin embargo, 20 hs DC, encontramos que la densidad mitótica era un 48% mayor en el compartimento posterior de los discos en regeneración que la de los controles (3.23 ± 1.11 en discos de ala en proceso de regeneración vs 2.19 ± 1.1 en discos control, $n=11$). Como ya había sido descrito, observamos que la mayoría de las células mitóticas estaban localizadas en el borde de la herida, que corresponde con la región donde se origina el blastema. En este momento, la proliferación en el compartimento anterior es comparable con la del control (Figura R 6 D-D'). A las 48 hs DC, encontramos que la densidad mitótica continuaba siendo mayor en el compartimento posterior de los discos en regeneración respecto a los controles (2.08 ± 1.51 en discos en regeneración vs 1.61 ± 1.06 en controles, $n=4$). Sin embargo, el índice mitótico a esta edad se vió reducido con respecto a estadios más tempranos (Figura R 6 E-E'), lo que sugiere que el pico de proliferación máximo es alrededor de las 20 hs DC.

Todos estos datos sugieren que después de la ablación, la proliferación celular se incrementa progresivamente en el borde de la herida y áreas cercanas a ésta. Nuestros resultados indican que en condiciones fisiológicas el pico máximo de proliferación se alcanza 20 hs DC, esto sucede mucho más temprano que en los experimentos de transplantes, en los cuales se observaba que el pico máximo de proliferación ocurría a las 72 hs después de transplantar el disco (Bosch, Baguna et al. 2008). Esta diferencia podría ser causada por el estrés traumático al que se ve sometido el disco durante el proceso de la ablación y transplante, causando una parada en el ciclo celular (Bosch, Baguna et al. 2008).

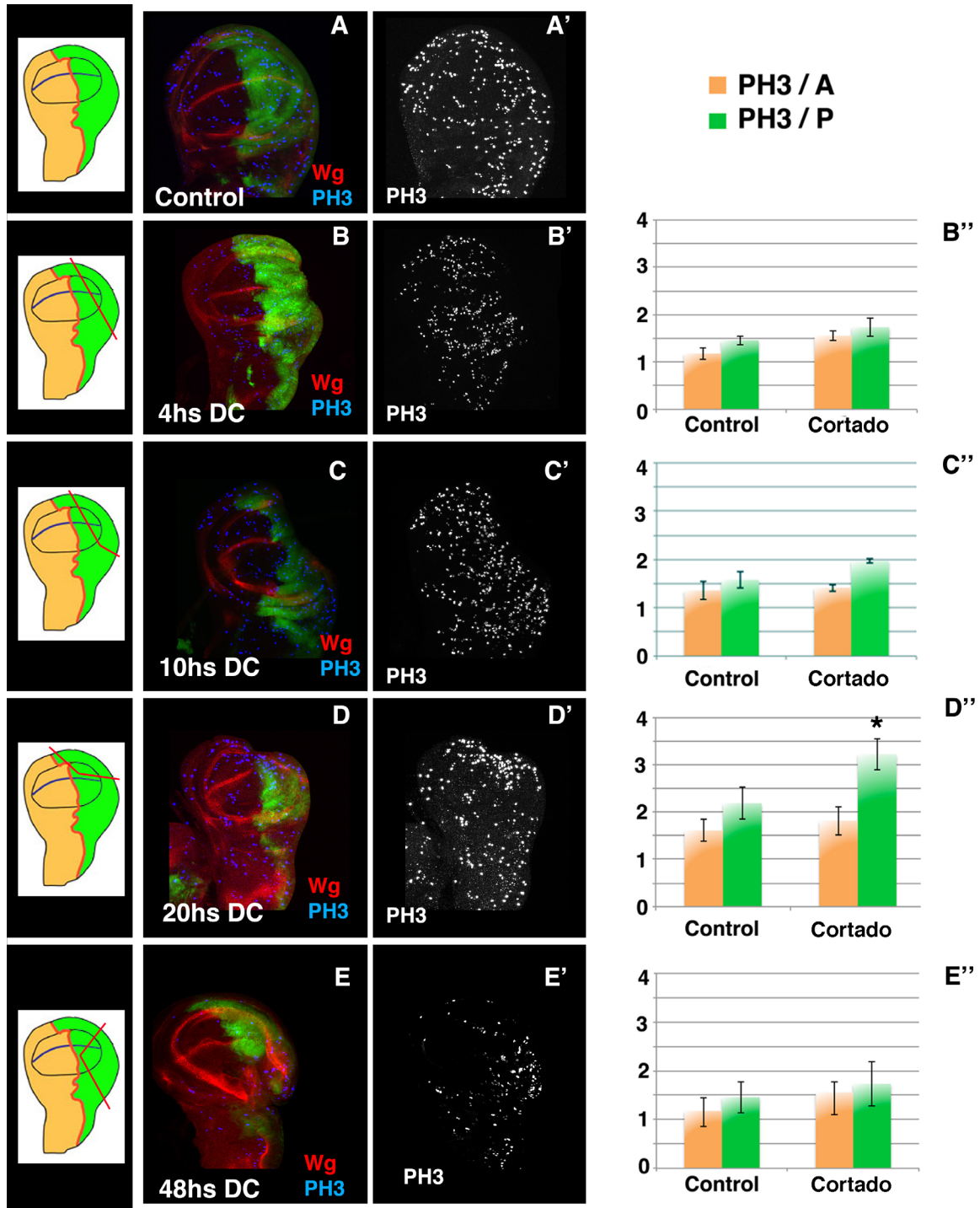


Figura R 6. Patrón de la proliferación celular durante el proceso de regeneración en el disco de ala (A-E'). Los discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP* de tercer estadio larvario fueron teñidos con el marcador mitótico Fosfo-Histona 3 (PH3) (en azul en A-E, y en gris en A'-E') y anti-Wg (rojo A-E). (B''-E'') Los gráficos de barras muestran el índice mitótico promedio en los compartimientos anterior y posterior de los discos control y en regeneración en diferentes momentos DC. (A-A') Discos de ala control. (B-B'') Discos en regeneración analizados 4-6 hs DC, el índice mitótico se incrementa ligeramente en ambos compartimientos en comparación con los controles. (C-C'') Discos en regeneración analizados 10 hs DC, en los que se observa un ligero incremento del índice mitótico, sutilmente

mayor que el observado entre 4-6 hs DC. (D-D'') Discos en regeneración analizados 20 hs DC, en los que se observa un aumento significativo en el índice mitótico en los compartimentos posteriores de los discos regenerados. En esta imagen se puede apreciar que la mayor parte de las células en división se encuentran en el borde de la herida. (E-E'') Discos en regeneración analizados 48 hs DC, en los que el índice mitótico del compartimento posterior es similar al del control. A la izquierda de cada panel se muestran ilustraciones esquemáticas donde se indica el tipo de corte que se realizó en cada disco. PH3 / A: número de células marcadas con PH3 / área del compartimento anterior; PH3 / P: número de células marcadas con PH3 / área del compartimento posterior. En todas las figuras el compartimento posterior está situado a la derecha y está marcado en verde por la expresión de *UAS-GFP* dirigida por *en-Gal4*. * $p < 0.05$ respecto al compartimento posterior de los discos contra-laterales control.

3. Caracterización del patrón de muerte celular en discos imaginales de ala regenerados

Las técnicas utilizadas hasta el momento para estudiar regeneración en *Drosophila* presentan distintos problemas que han impedido realizar un análisis pormenorizado de la función de la muerte celular durante este proceso. En estudios previos realizados utilizando la técnica del transplante de discos, se ha observado un fuerte incremento de la muerte celular no sólo en discos en regeneración, sino también en discos controles (Bosch, Baguna et al. 2008). Utilizando este método, no era posible distinguir si el incremento de la muerte celular era consecuencia de la regeneración o se debía al estrés traumático sometido a los discos durante el transplante. Además, este sistema no permite analizar el patrón y tamaño del órgano adulto tras la regeneración en discos en los que se ha bloqueado la muerte celular. La técnica que hemos desarrollado evita ambos problemas, por lo que decidimos utilizar este método para estudiar la función de la muerte celular durante la regeneración. Para ello, analizamos la expresión de la Caspasa3 en discos controles y en regeneración a distintos momentos tras el corte. Para ello, utilizamos un anticuerpo específico que reconoce la forma activada de esta proteína en las células apoptóticas

El patrón de muerte celular entre 3-20 hs después de la amputación varió dependiendo de si el fragmento amputado afectaba sólo a un compartimento en menor o mayor medida, o incluía gran parte de ambos compartimentos. Así, cuando eliminamos sólo parte del compartimento P, encontramos que a las 3 horas DC hay una ligera acumulación de células positivas para Caspasa 3 en el borde de la herida (Figura R 7 B-B'). A las 6 horas, además de las células apoptóticas alrededor de la herida, encontramos que la muerte celular comienza a extenderse hacia regiones del compartimento anterior del disco. En la mayoría de los discos encontramos que las células que se están muriendo aparecen cerca del borde dosal/ventral (Figura R 7 C-C'). Transcurridas 20 horas después del corte, seguimos encontrando células muriendo en el borde de la herida y además aparecen grupos de células apoptóticas en el compartimento anterior. En general, observamos que el número de células en apoptosis en la región presuntiva de ala a las 20 hs disminuye con respecto a discos analizados tras 6hs

DC. A las 48 hs DC, se observó la presencia de muerte celular en pequeños cúmulos cerca del lugar donde se produjo la herida (Figura R 7 E-E').

Cuando la región amputada afectó a más del 50% de ambos compartimentos, encontramos que había un fuerte incremento de la muerte celular en todo el disco de ala desde las 4-6 horas DC. Transcurridas 6 hs, un gran número de células de la región presuntiva de ala expresan Caspasa 3, sugiriendo que muchas células dentro de este territorio van a ser eliminadas por muerte celular (Figura R 7).

Nuestros resultados indican que durante el proceso de regeneración hay un incremento de la muerte celular tanto en regiones cercanas al borde de la herida, como en regiones alejadas de esta. Estos datos sugieren que tras el corte, la activación de distintas señales celulares podría inducir la muerte celular más allá de las regiones adyacentes a la herida.

4. Caracterización de los cambios en la expresión de genes implicados en la formación de patrón durante la regeneración

El ala adulta de *Drosophila* presenta un patrón característico constituido por regiones de venas e intervenas y diferentes elementos sensoriales. Este patrón se define durante el desarrollo larvario por la acción de diferentes genes y vías de señalización. De manera que, en discos de ala de tercer estadio larvario se puede observar la expresión restringida de diferentes genes que prefiguran el patrón de vena/intervena que aparece en las alas adultas. Así, las células que darán lugar al territorio de intervena se pueden distinguir analizando la expresión del gen *blistered* (*bs*), cuya función es requerida para la correcta diferenciación de estas células (Fristrom, Gotwalds et al. 1994) (Figura R 8), mientras que las células que diferenciarán como vena pueden reconocerse analizando la expresión de *Delta* (*DI*) (Figura R 9). El gen *Delta* codifica para un ligando que se une al receptor Notch y activa la vía a la que da nombre este receptor, la ruta de señalización de Notch. Esta ruta juega un papel crucial en la formación del margen de ala y la definición de la anchura de las venas. Para estudiar la actividad de la vía de Notch analizamos la expresión del reportero *E (spl) Mβ-CD2*, que se expresa en el tejido de intervena y en el borde D/V en respuesta a la activación de esta vía (Figura R 7). Para analizar la evolución del patrón de vena/intervena durante el proceso de regeneración examinamos la expresión de estos marcadores en diferentes momentos después de la amputación. El tamaño del fragmento cortado varió entre 20-60% del compartimento P. Entre 0-6 horas después de la amputación, observamos que la expresión de *Bs* (n=5), *E (spl) Mβ-CD2* (n=4) y *DI* (n=3) era similar a la de los discos contralaterales

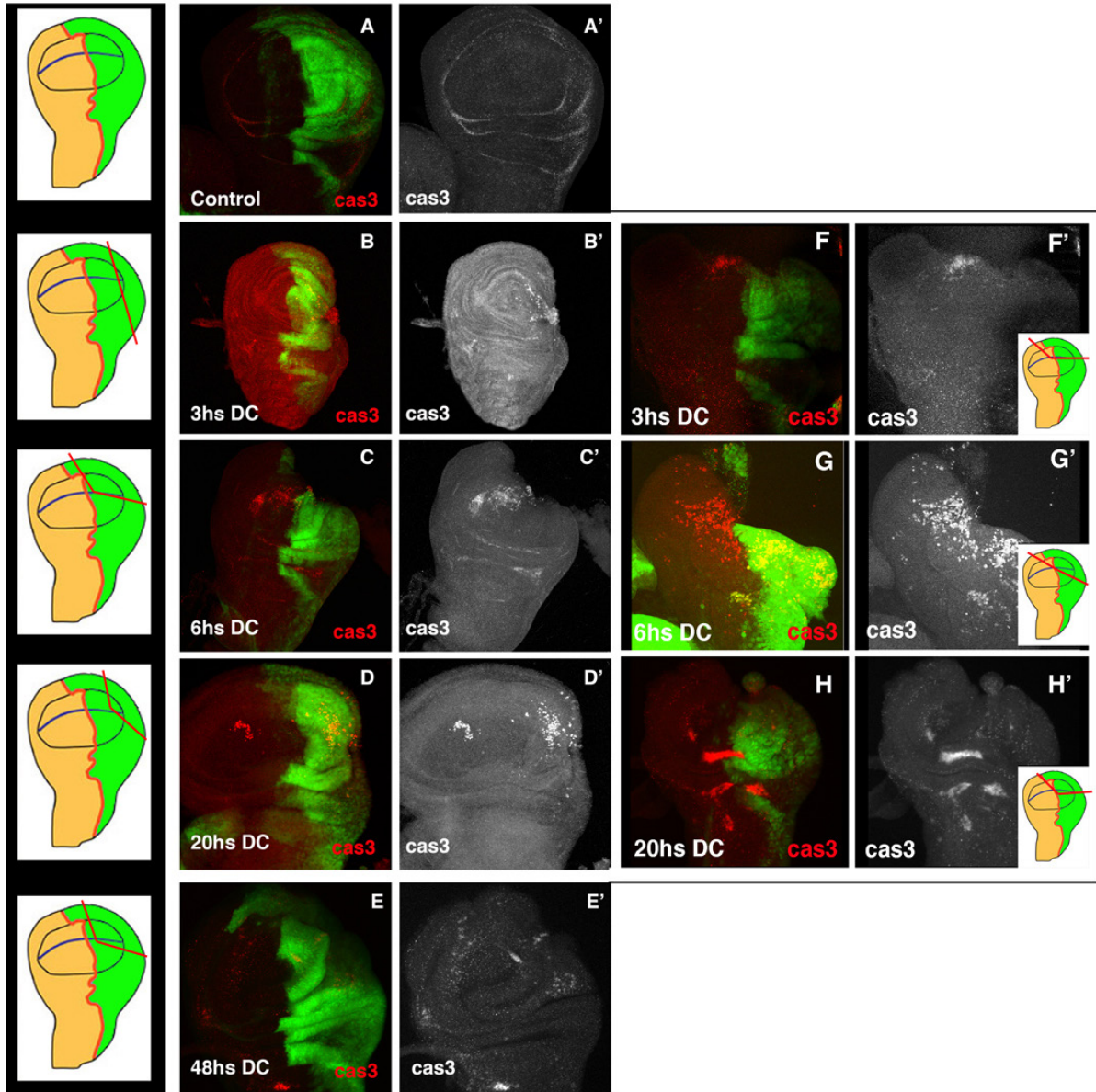


Figura R 7. Patrón de muerte celular durante el proceso de regeneración en el disco de ala (A-E'). Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con el marcador de muerte celular Caspasa 3 activada (*cas3*) (en rojo en A-E, y en gris en A'-E'). (A-A') Discos de ala control. (B-B') Discos regenerados analizados 3 hs DC, donde se observa que la apoptosis se incrementa en el borde de la herida. (C-C') Discos regenerados analizados 6 hs DC, en los que observamos células apoptóticas no solo por el borde de la herida, sino también en áreas adyacentes, afectando al compartimento A. (D-D') Discos regenerados analizados 20 hs DC, en los que aparecen grupos de células positivas para Caspasa3 cerca del borde de la herida y en general hay cúmulos de muerte celular en el compartimento A. (E-E') Discos regenerados analizados 48 hs DC, donde observamos que hay una disminución de células apoptóticas en todo el disco, comparado con edades más tempranas. A la izquierda de cada disco cortado se encuentra un esquema que representa el tipo de corte infligido. (F-H') Discos con grandes cortes que afectan el borde A/P, 3 hs DC (F-F') 6 hs DC (G-G') y 20 hs DC (H-H'), donde se observa el incremento de muerte celular en la región presuntiva de ala más tempranamente, que en las que se afecta un solo compartimento. En todas las figuras el compartimento posterior está situado a la derecha y está marcado en verde por la expresión de *UAS-GFP* dirigida por *en-Gal4*.

que utilizamos como control interno (Figura R 8 B-B' F-F' y R 9 B-B'). Esto ocurre con independencia del tamaño de la región amputada. Transcurridas 10-15 hs DC, encontramos que la expresión tanto de Bs como de DI disminuye sutilmente en el borde de la herida, mientras que en el resto del territorio presuntivo de ala es similar a la de los discos controles. Este efecto fue parecido en todos los discos analizados, independientemente del tamaño de la región seccionada (Figura R 8 C-C' y R 9 C-C'). Entre las 20-24 horas DC, observamos que cuando la región amputada era menor del 40% del compartimento P, los niveles de Bs (n=6), *E (spl)* *Mβ*-CD2 (n=10) y de DI (n= 13) se encontraban reducidos en las regiones adyacentes a la herida, y el patrón de expresión característico de estos marcadores en las regiones de vena/intervena, desaparecía en el compartimento P (Figura R 8 C-C', G-G' y R 9 C-C').

Este efecto fue mucho más evidente cuando el fragmento amputado era mayor del 40% del compartimento posterior, ya que la expresión de estos marcadores no sólo se reducía en este compartimento, sino que además desaparecía en el compartimento anterior en más del 50% de los discos analizados (Figura R 8 C-C', G-G' y R 9 C-C'). Transcurridas 48 hs DC, el patrón de expresión de estos marcadores de destino celular comenzó a reestablecerse (Figura R 8 D-D' y R 9 D-D').

Debido a que el patrón del disco es dinámico y cambia rápidamente durante el desarrollo, el momento de desarrollo en el que se encontraban los discos cortados se infirió a partir de las comparaciones individuales entre los discos en proceso de regeneración y los discos contra-laterales sin cortar que usamos siempre como control interno.

Nuestros datos sugieren que durante el proceso de regeneración, las células de vena/intervena pierden temporalmente el compromiso de destino celular en el borde de la herida. Esta pérdida de destinos celulares también ha sido descrita previamente en los experimentos en los que se induce ablación genética. Sorprendentemente, encontramos que este efecto también parece extenderse a regiones adyacentes y alejadas del borde de la herida.

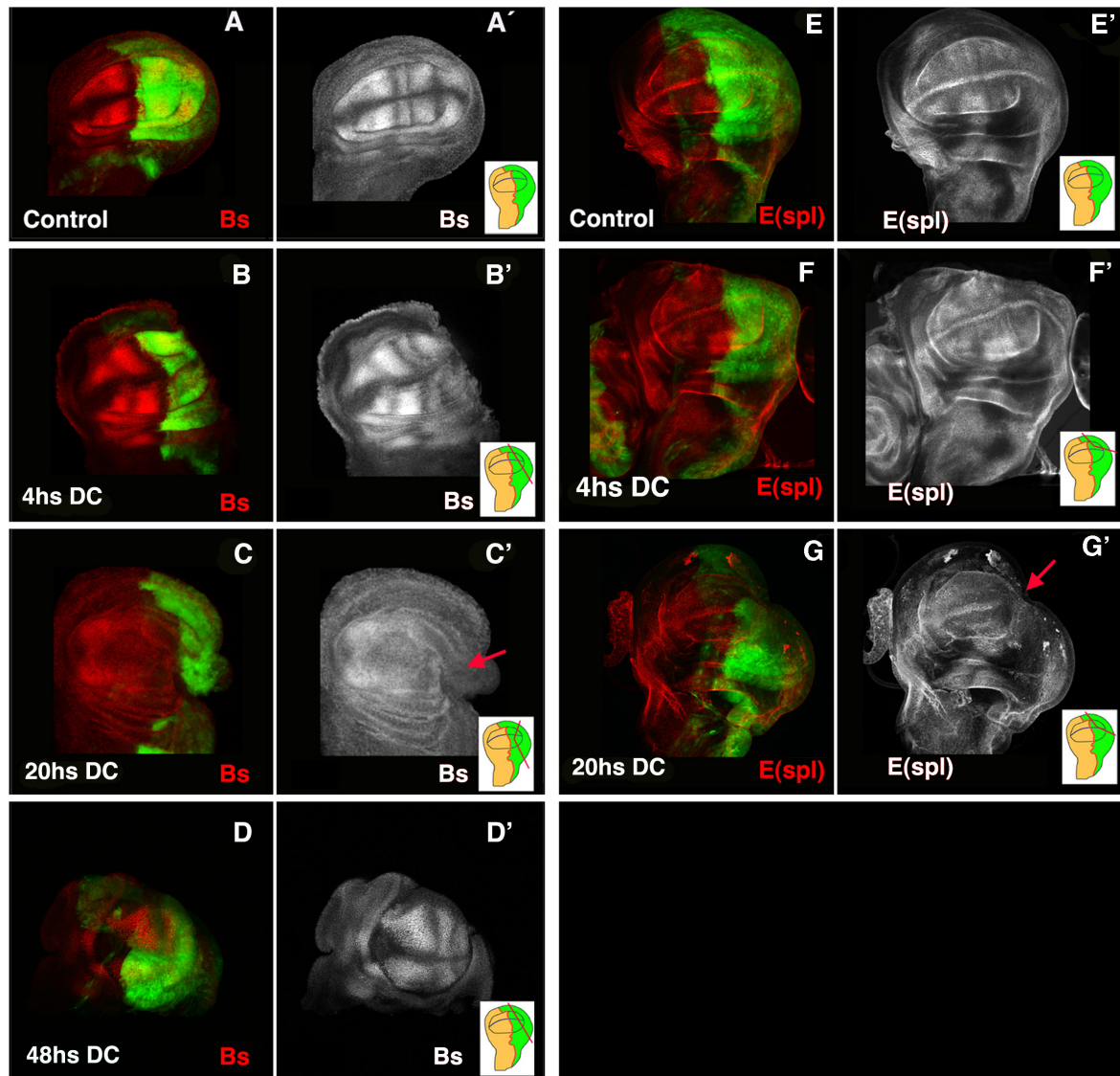


Figura R 8. Durante el proceso de regeneración se produce una pérdida temporal de la expresión de marcadores de destino celular. (A-D') Discos imaginales de tercer estadio larvario teñidos con anti-Bs (en rojo A-D y en gris A'-D'). Disco control (A-A') y discos en regeneración (B-D'). (B-B') 4 horas DC la expresión de Bs es similar a la de los controles (A-A'). (C-C') 20 hs DC el patrón de vena/intervena definido por la expresión de Bs desaparece de la región posterior del disco y de parte del compartimento anterior. Además, cerca del borde de la herida se observó una bajada de la expresión de este marcador (flecha roja). (E-G') Patrón de expresión de la construcción *E(spl)mβ-CD2* durante el proceso de regeneración. El patrón de expresión de *E(spl)* se muestra en rojo en (E-G) y en gris en (E'-G') tanto en el control (E-E') como en los discos regenerados (F-G'). (F-F') 4 horas DC la expresión de *E(spl)* es similar a la de los discos controles. (G-G') 20 hs DC la expresión de *E(spl)* característica en el borde D/V desaparece en la región adyacente al borde de la herida (flecha roja) y el patrón de vena/ interviena definido por este gen también desaparece en el compartimento posterior y anterior, aunque los cortes sólo afecten al compartimento P. En los esquemas se indica el tipo de corte realizado y la región eliminada en cada disco. En todas las figuras el compartimento posterior está situado a la derecha y está marcado en verde por la expresión de *UAS-GFP* dirigida por *en-Gal4*.

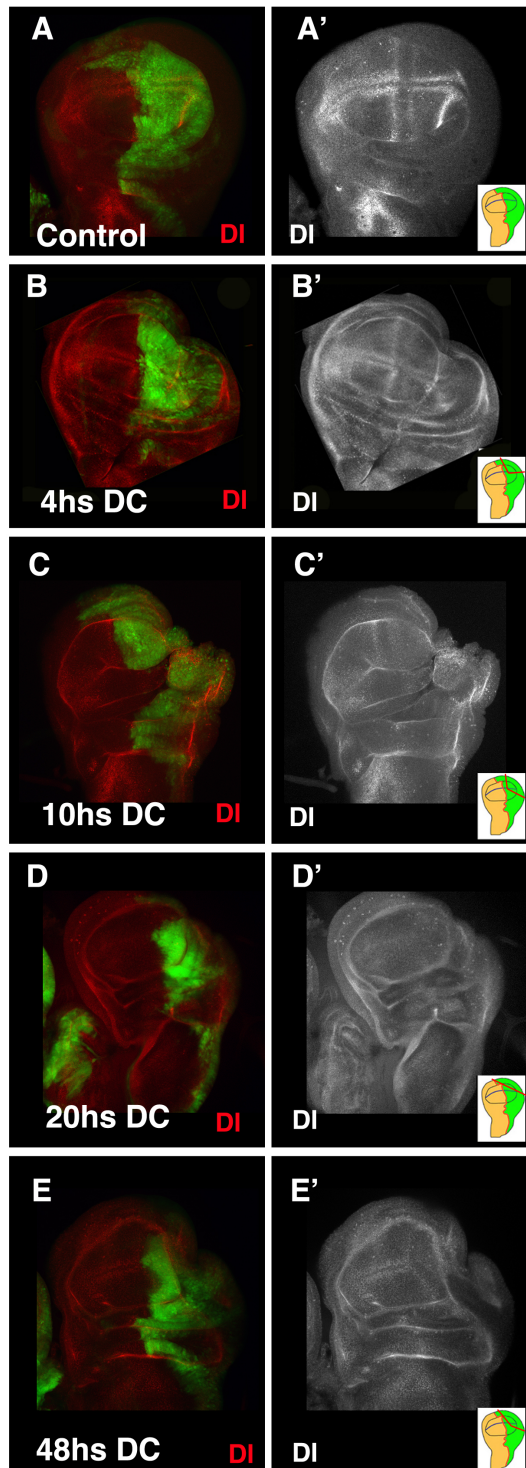


Figura R 9. Patrón de expresión de DI durante el proceso de regeneración. (A-E') Discos imaginales de tercer estadio larvario teñidos con anti-DI (en rojo A-E y en gris en A'-E') en discos controles (A-A') y en discos en regeneración (B-E'). (B-B') 4 horas DC la expresión de DI es similar a la de los controles. (C-C') 10 hs DC la expresión de DI comienza a desvanecerse del borde D/V en la región cercana a la herida. (D-D') Transcurridas 20 hs DC el patrón de venas definido por DI desaparece en el compartimiento posterior y también en parte del anterior, aunque los cortes sólo afectan al compartimiento posterior. (E-E') 48 hs DC la expresión de DI se restablece en el territorio putativo de ala. En los esquemas se indica el tipo de corte realizado y la región eliminada en cada disco. En todas las figuras el compartimiento posterior está situado a la derecha y está marcado en verde por la expresión de *UAS-GFP* dirigida por *en-Gal4*.

5. Caracterización del comportamiento de los bordes de compartimento durante la regeneración

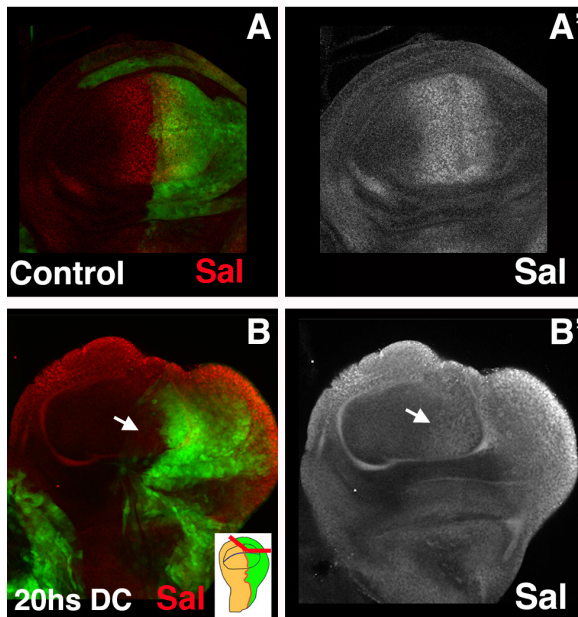
La compartimentación del disco de ala da lugar a la expresión localizada de moléculas de señalización en los bordes de los compartimentos (Blair 1995). De esta manera, la formación del borde A/P induce la expresión diversos genes, entre ellos la del gen *decapentaplegic* (*dpp*), que codifica para un factor secretable miembro de la superfamilia de los TGF β (Lawrence and Struhl 1996). Este factor difunde y promueve la expresión de distintos genes diana de forma dependiente de su concentración, como son los genes *spalt* (*sal*) y *mothers against dpp* (*mad*). Así, la expresión de estos genes puede ser utilizada como un reportero de la actividad de la ruta de señalización de *dpp* (Affolter et al., 2001).

Por otro lado, en el borde D/V la confrontación entre células que expresan el gen selector dorsal apterous (*ap*) con células que no lo expresan, activa la vía de señalización de Notch, que a su vez promueve la expresión del factor secretable de la familia Wnt *wingless* (*wg*) (Couso et al., 1993; Blair et al., 1994; Williams et

al., 1994; Ng et al. 1996). Todas estas señales tienen un papel central para la regulación del crecimiento y la formación del patrón del ala.

Examinamos si el proceso de regeneración daba lugar a cambios en la identidad de las células que constituyen los compartimentos o alteraba la integridad de los bordes entre estos. Para ello, estudiamos a diferentes tiempos DC (0-6, 18-20 hs), la expresión de los genes selectores *engrailed* (*en*) y *apterous* (*ap*) y la expresión de los factores diana de *dpp*, *Sal* (Figura R 10 B-B') y la forma fosforilada de Mad (*pMad*) (Figura R 11 B-B'''). Además, examinamos la distribución de *Wg*, de cuya activación depende la correcta formación del borde D/V.

Tras amputar los discos y analizarlos a distintos tiempos después del corte, observamos que la expresión de *en* no se alteraba de forma significativa durante el proceso regenerativo. El único efecto destacable fue que en ocasiones la expresión de este gen a lo largo del borde A/P no es tan definida y precisa como en discos controles. Un efecto similar ha sido descrito con experimentos de ablación genética, en los que se ha observado que existen transgresiones en la restricción clonal impuesta por el borde A/P por parte de las células de ambos compartimentos (Herrera, Martin et al. 2013). La capacidad organizativa de este borde no parece estar muy alterada, ya que tanto la expresión de *Sal* como la de *pMad* son similares en los discos en regeneración y en los discos controles que no habían sido amputados. La única diferencia mencionable es que los niveles de ambos factores disminuyen ligeramente en los bordes de la herida (Figura R 10 y R 11). En todos los casos, se analizaron discos en los que el corte sólo afectaba al compartimento posterior.



Nuestros experimentos indican que la expresión del gen selector dorsal *apterous* no sufre cambios significativos durante la regeneración (Figura R 11 y R 12). Sin embargo, a pesar de este resultado, en-

Figura R 10. Expresión de Spalt durante la regeneración. *Sal* se expresa en el dominio central del territorio putativo de ala y contribuye a la formación del patrón de las venas L2 y L5. Tanto en el disco control (A-A') como en el disco regenerado 20 hs DC (B-B'), la expresión de *Sal* no cambia su localización pero si disminuye en la zona del blastema. El hecho de que en el disco cortado parezca que la expresión está lateralizada es simplemente por el hecho de que falta tejido del compartimento P. (A-B) Expresión de *Sal* en rojo y en A'-B' la expresión de *Sal* en gris. Las flechas blancas indican donde comienza la expresión de *sal* en el disco cortado.

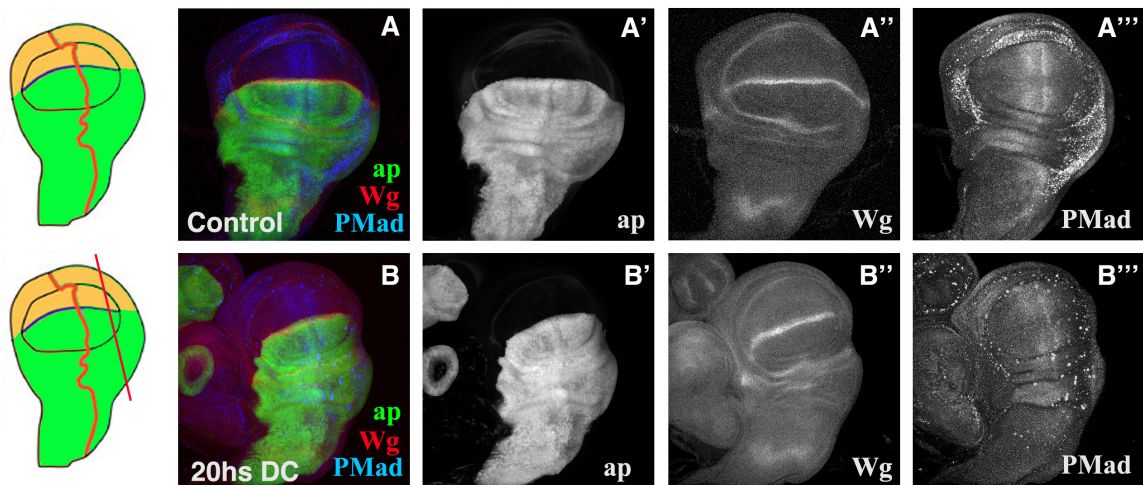


Figura R 11. Expresicón de ap y pMad en discos regenerados (A-A''') y controles (B-B'''). Los discos de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP* de tercer estadio larvario se tiñeron con anti-P-Mad (en azul A y B, y en gris A''' y B''') y anti-Wg (en rojo A y B, y gris A'' y B''). La expresión de GFP (verde) bajo el control de *ap-Gal4* marca el compartimento dorsal. (B-B''') A las 20 hs DC ninguno de los discos en estudio presentaron alteraciones en el patrón de expresión de ap (B, B') o pMad (A, A''' y B, B'''). La expresión de pMad no se vió alterada durante la regeneración, en comparación con el control (A y A'''). En este tiempo, la expresión de Wg se redujo en el borde D/V en los discos en proceso de regeneración,. A la izquierda de la figura se muestra una ilustración donde se indica el tipo y tamaño de corte realizado en cada disco.

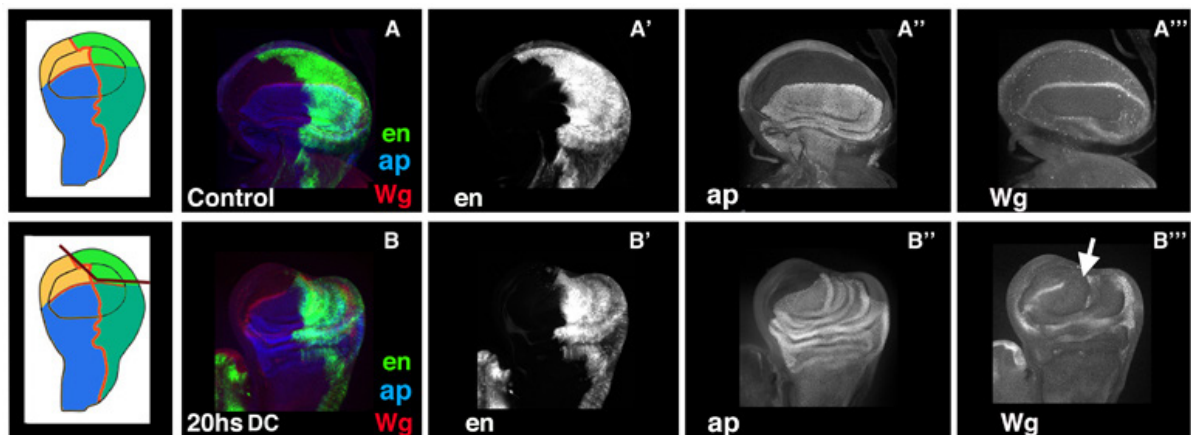


Figura R 12. La integridad de los compartimentos no se altera durante el proceso de regeneración. (A- B''') Discos de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* de tercer estadio larvario durante la regeneración. Todos los discos están teñidos con *ap-lacZ* (en azul A y B, y en gris A'' y B''') y anti-Wg (en rojo A y B, y en gris A''' y B'''). la expresión de GFP (verde) bajo el control de *en-Gal4* marca el compartimento posterior. A 20 hs DC la expresión de *ap* (B, B'') y *en* (A, A' y B, B') es comparable a la de los controles. Nótese que a pesar de que la expresión de *ap* es normal, Wg desaparece de un fragmento del borde D/V (indicado por la flecha blanca en B'''). A la izquierda de la figura se muestra una ilustración donde se indica el tipo y tamaño de corte realizado en cada disco.

contramos que transcurridas 20 hs DC, la expresión de Wg disminuía de forma significativa a lo largo del borde D/V.

6. Análisis de los cambios en la expresión de Wg en el borde D/V durante el proceso de regeneración

Estudios previos han sugerido que la expresión de Wg es necesaria durante el proceso de regeneración. Así, se ha observado que tras la amputación de parte del disco de pata, *wg* es ectópicamente expresado en el borde de la herida, (Schubiger, Sustar et al. 2010). La inducción de muerte celular como sistema para estudiar regeneración también ha revelado que Wg aparece de forma ectópica en el disco de ala durante la regeneración (Smith-Bolton, Worley et al. 2009). Por el contrario, nuestros resultados indican que 20 hs DC, Wg no sólo no es expresado ectópicamente, sino que sus niveles disminuyen a lo largo del borde D/V (Figura R 12). Una posible explicación para explicar esta discrepancia es que la expresión de Wg se incrementa inicialmente, pero que más tarde sus niveles disminuyan. Para analizar si este era el caso, examinamos la evolución de la expresión de Wg a distintos tiempos tras la amputación de fragmentos de entre 10-50% del compartimento posterior del disco de ala. En el tercer estadio larvario, Wg se expresa en el disco imaginal de ala a lo largo del borde D/V y en dos círculos concéntricos, el anillo interno, que delimita la región presuntiva del ala, y el anillo externo que define la región del territorio que dará lugar a la axila. Encontramos que entre 0-6 horas DC, la expresión de Wg es similar en los discos amputados y en los controles (Figura R 13 B-B'). Transcurridas 18-24 horas DC, observamos que la expresión Wg desaparece del borde D/V en todos los discos analizados (n=25) (Figura R 13 C-C'). Por otra parte, en el 48% de estos discos la expresión de Wg en el borde D/V del compartimento anterior disminuye, a pesar de que sólo se había eliminado un fragmento del compartimento posterior (Figura R 13 C-C'). En este intervalo de tiempo, encontramos que la expresión de Wg en el anillo interno estaba, bien completamente (40%, n=25) o parcialmente restaurada (Figura R 13 D-D'). Cuando la sección amputada era mayor del 40% del compartimento P, el restablecimiento del anillo interno de Wg redefine una nueva región presuntiva de ala que es significativamente menor que la misma región de los discos controles (Figura R 13 D-D'). En todos los discos examinados a las 48 hs DC, la expresión del anillo interno de Wg estaba completamente restablecida, mientras que su expresión a lo largo del borde D/V aparecía completamente restaurada en el 66% de los discos analizados (n=6) (Figura R 13 E-E').

Como era de esperar, observamos que la expresión del gen diana de Wg, *senseless* (*ss*) estaba ausente en gran parte del borde D/V en discos en proceso de regeneración, a las 20 hs DC (Figura R 14).

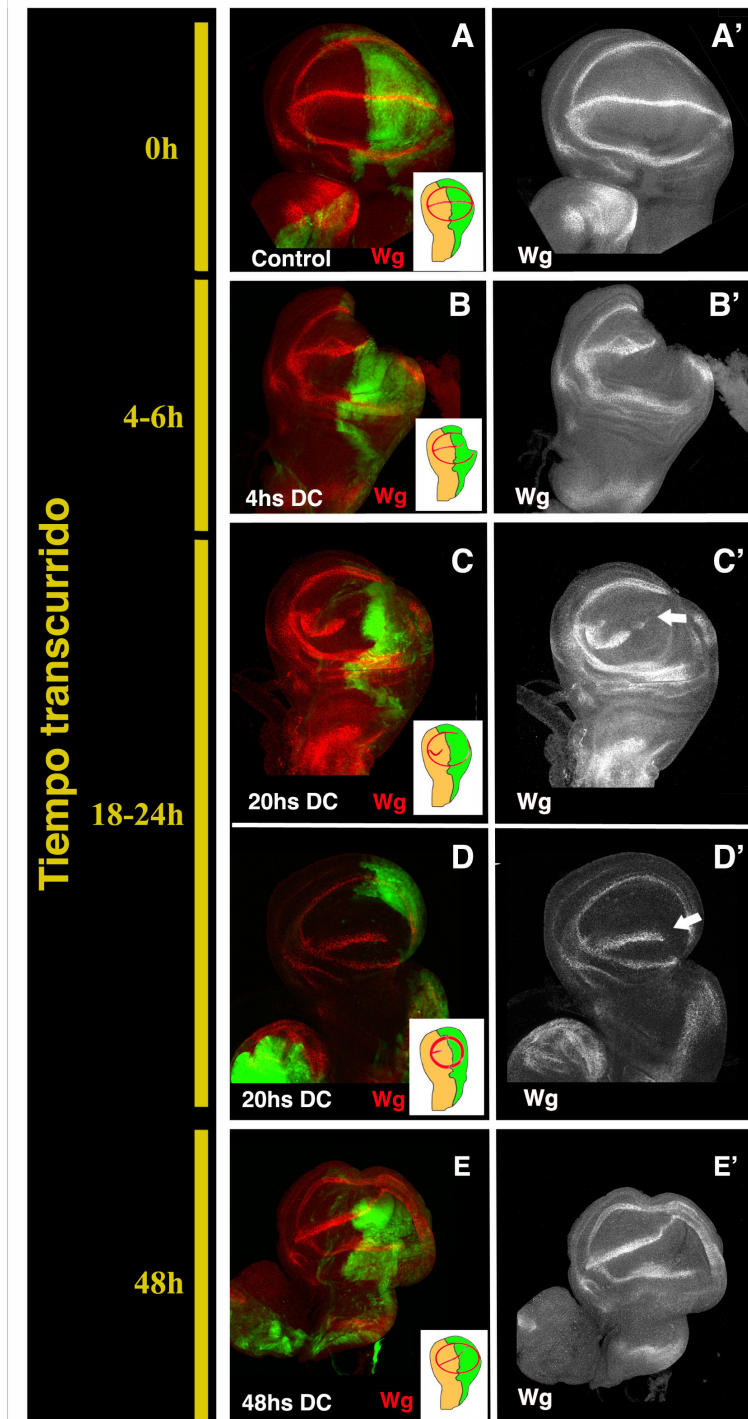


Figura R 13. Evolución de la expresión de Wg durante el proceso de regeneración. (A-E) Expresión de Wg revelada por la tinción con anti-Wg (en rojo en A-E y en gris A'-E') en discos controles de larvas en tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* (A-A') y discos regenerados analizados a diferentes tiempos DC (B-E'). En el recuadro inferior de la derecha de las imágenes se muestran esquemas de los discos, indicando el tipo de corte y el tamaño de las regiones eliminadas en los discos mostrados en cada panel. (B-B') La expresión de Wg no se alteró entre 0-4 hs DC. (C-D') 20 hs DC la expresión de Wg desaparece del borde D/V cerca del borde de la herida, así como en una sección del compartimento anterior en el borde D/V (flechas blancas en C' y D'). En este momento, la expresión del anillo interno de Wg fue parcialmente (C-C') o totalmente (D-D') restaurada. En esta imagen se puede observar la reducción del territorio putativo del ala redefinido por el re-establecimiento del anillo interno de Wg (D-D') comparado con el control A-A'). (E-E') A 48 hs DC se ha redefinido un nuevo territorio de ala y reestablecido el borde D/V completamente.

La disminución de los niveles de Wg podría deberse a una regulación transcripcional del gen, o a que los niveles de la proteína fuesen modulados durante la regeneración. Para estudiar estas dos posibilidades utilizamos una estirpe transgénica en la que el gen *lac-Z* se encuentra bajo la regulación de la región promotora de *wg* (*wg-lacZ*) (Figura R 15). El patrón

Resultados

de expresión de este reportero reprodujo los resultados descritos por el anticuerpo anti-Wg, indicando que los cambios encontrados en los niveles de expresión de Wg están causados por la regulación transcripcional de este gen (Figura R 15).

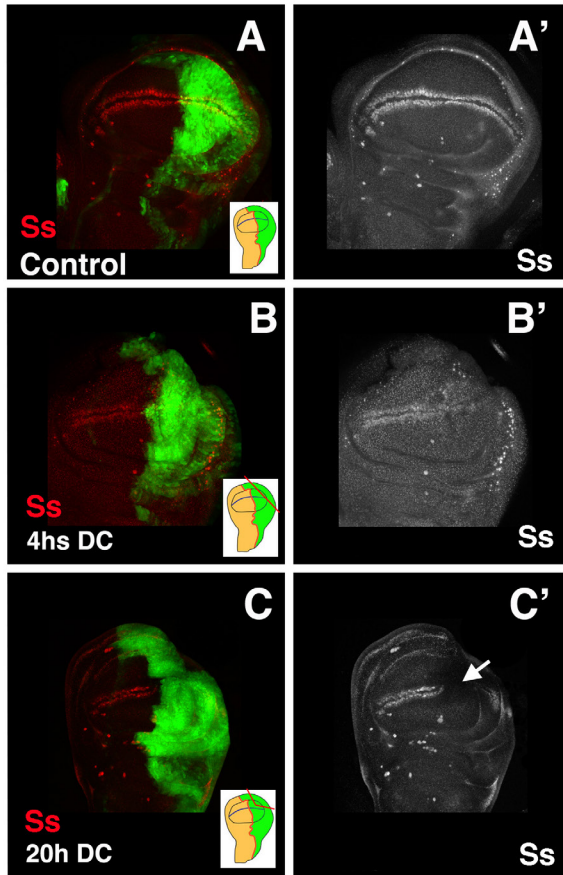


Figura R 14. Análisis de la expresión del gen diana de *Wg* senseless (*Ss*) durante el proceso de regeneración. (A-E) Expresión de *Ss*, que se muestra por la tinción con anti-*Ss* (en rojo en A-C y en gris A'-C') en discos controles de larvas en tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* (A-A') y discos en regeneración analizados a diferentes tiempos DC (B-C'). En el recuadro inferior derecho se muestran esquemas de los discos indicando el tipo de corte y el tamaño de las regiones eliminadas, así como la interpretación del patrón de expresión de *Wg* para los discos mostrados en los paneles (A-C). (B-B ') La expresión de *Ss* no se alteró entre 0-4 hs DC. (C-C') 20 hs DC, *Ss* desaparece del borde de la herida y regiones adyacentes (flecha blanca en C').

Cortes en el compartimento anterior de los discos imaginales de ala, reprodujeron los mismos resultados que los observados con los cortes en el compartimento P (Figura R 16).

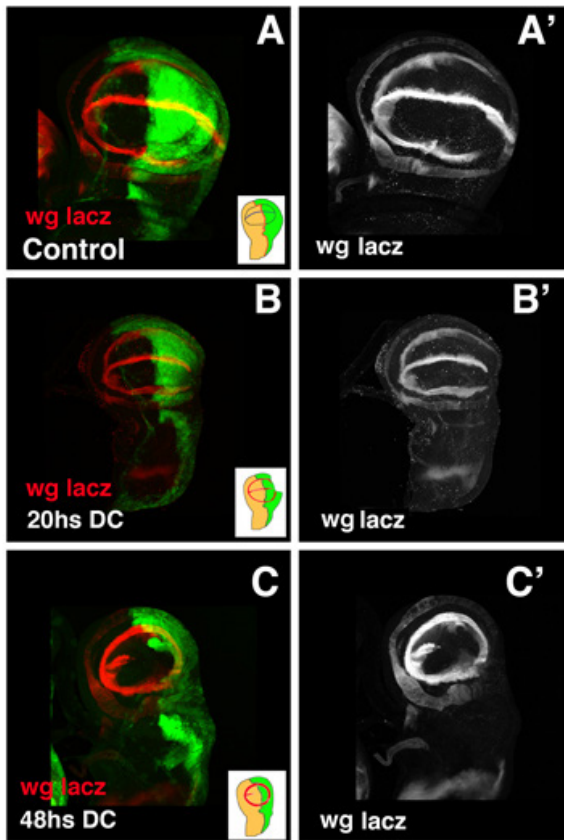
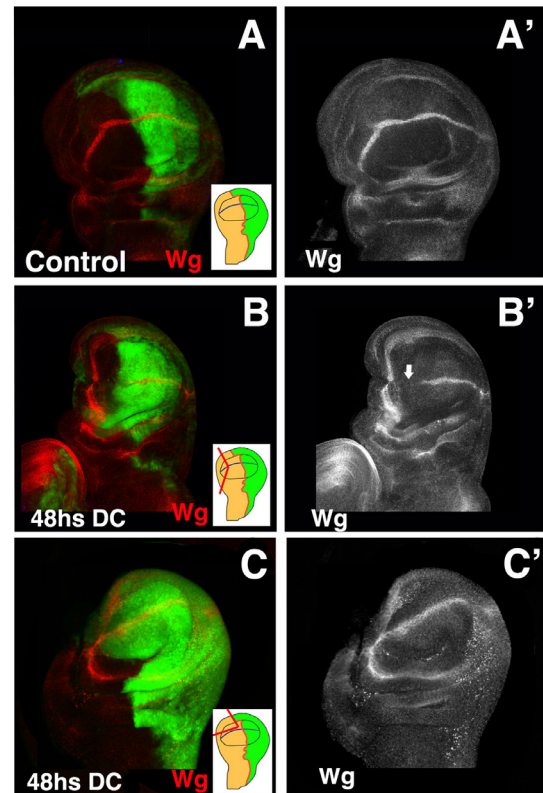


Figura R 15. Análisis de los niveles transcripcionales de *wg* durante el proceso de regeneración. (A-C) Expresión de *wg-LacZ*, que se muestra por la tinción con anti-βGal (anti-β-galactosidasa, en rojo A-C y en gris en A'-C') en discos controles de larvas en tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* (A-A') y discos regenerados analizados a diferentes tiempos DC (B-C'). En el recuadro inferior derecho, se muestran esquemas de los discos, indicando el tipo de corte y el tamaño de las regiones eliminadas, así como la interpretación del patrón de expresión de *wg* para los discos mostrados en los paneles (A-C). (B-B') La expresión del reportero *wg-LacZ* se redujo en el borde D/V de discos analizados 20 horas DC, en comparación con el control (A-A'). (C-C') 48 hs DC la expresión del reportero *wg-LacZ* continuaba reducida en el borde D/V, aunque los anillos de *wg* se hubieran reestablecido por completo re-definiendo una nueva región presuntiva de ala significativamente más pequeña que la misma región de los discos controles.

Figura R 16. Cuando el corte es infligido en el compartimento anterior, la expresión de Wg sigue la misma evolución que cuando se inflige en el compartimento posterior. (A-B') Expresión de Wg, que se muestra por la tinción con anti-Wg (en rojo en A-B y en gris A'-B') en discos controles de larvas en tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4UAS-GFP* (A-A') y disco en regeneración analizado a 48 hs DC (B-B'). (B-B') 48 hs DC la expresión de Wg aún no se ha re-establecido en el borde D/V cerca del borde de la herida (flechas blancas en B'). En este momento la expresión del anillo interno de Wg está totalmente restaurada. En esta imagen se puede observar la reducción del territorio putativo del ala redefinido por re-establecimiento del anillo interno de Wg (B-B' comparado con el control A-A'). En el recuadro inferior de la derecha de las imágenes se muestran esquemas de los discos, indicando el tipo de corte y el tamaño de las regiones eliminadas, así como la interpretación del patrón de expresión de Wg para los discos mostrados en los paneles (A-B).



7. Estudio del requerimiento de Wg durante la regeneración

Los datos mostrados en el apartado anterior indican que la expresión de *wg* en algunas regiones del disco del ala se reduce durante la regeneración. Esto sugiere que es posible que la función de este gen no sea necesaria para al menos las etapas iniciales del proceso regenerativo. Para estudiar el requerimiento de *wg* durante la regeneración, bloqueamos su función en discos de ala cortados, sobre-expresando un ARNi específico contra *wg*. La sobre-expresión de *UAS-wg^{ARNi}* bajo la regulación de *engrailed-Gal4* no produjo ningún efecto cuando las larvas se mantuvieron a 17°C durante todo el desarrollo. Las alas adultas procedentes de estas larvas resultaron ser indistinguibles de las alas control (Figura R 17 A-A"). Sin embargo, cuando estas larvas se traspasaban a 25°C durante el tercer estadio larvario (216-240 hs AEL), las alas de los adultos desarrollados a partir de ellas, mostraban grandes muescas en el compartimento posterior (Figura R 18). Para bloquear la función de la señalización de *wg* durante el proceso de regeneración, las larvas *en-Gal4 UAS-wg^{ARNi}* fueron mantenidas a 17°C durante su desarrollo hasta el tercer estadio de larvario, momento en el que se traspasaron a 25°C 24 horas antes de la amputación. Tras la ablación, las larvas se mantuvieron a esa temperatura hasta que fueron disecados a distintos tiempos. Los discos de ala de estas larvas mostraron una fuerte disminución de la expresión de *wg* en el compartimento posterior (Figura R 17 B-B"). Además para corroborar que *wg* no se expresaba en este compartimento, analizamos la expresión de su gen diana *senseless* (*ss*). Después de 24 hs a 25°C, observamos que la disminución de la expresión de *wg* llevaba aparejada una reducción de su actividad, ya que la expresión de *Ss* desapareció (Figura R 17 D-D").

Una de las etapas iniciales de la regeneración de órganos es el proceso de cicatrización de la herida. Examinamos si este proceso estaba afectado cuando reducíamos los niveles de Wg en el compartimento P. Como se describió previamente en Bosch *et al.* (Bosch et al., 2005) en discos de genotipo salvaje durante las primeras etapas de este proceso, las células adyacentes al borde de la herida forman un cable rico en Actina (Figura R 19 A-A"). En nuestras condiciones experimentales observamos que la formación de este cordón de Actina se produce 1-2 hs DC. Además, encontramos que la integridad epitelial a esta edad está restablecida. Estos datos indican que en condiciones fisiológicas, el proceso de cicatrización ocurre mucho antes que en discos transplantados. En discos amputados en los que se había bloqueado la expresión de *wg*, obtuvimos resultados similares (Figura R 19 B-B").

A continuación, examinamos si la generación del blastema en estos discos se veía alterada como consecuencia de los bajos niveles de Wg. En discos *en-Gal4 UAS GFP; UAS-wg^{ARNi}* crecidos a 25° encontramos que, en comparación con los discos control, se redujo el índice mitótico tanto en el compartimento anterior como en el posterior (Figura R 17 A"-D" y R 20). Esta reducción también era evidente en los discos cortados. Sin embargo, 20 horas

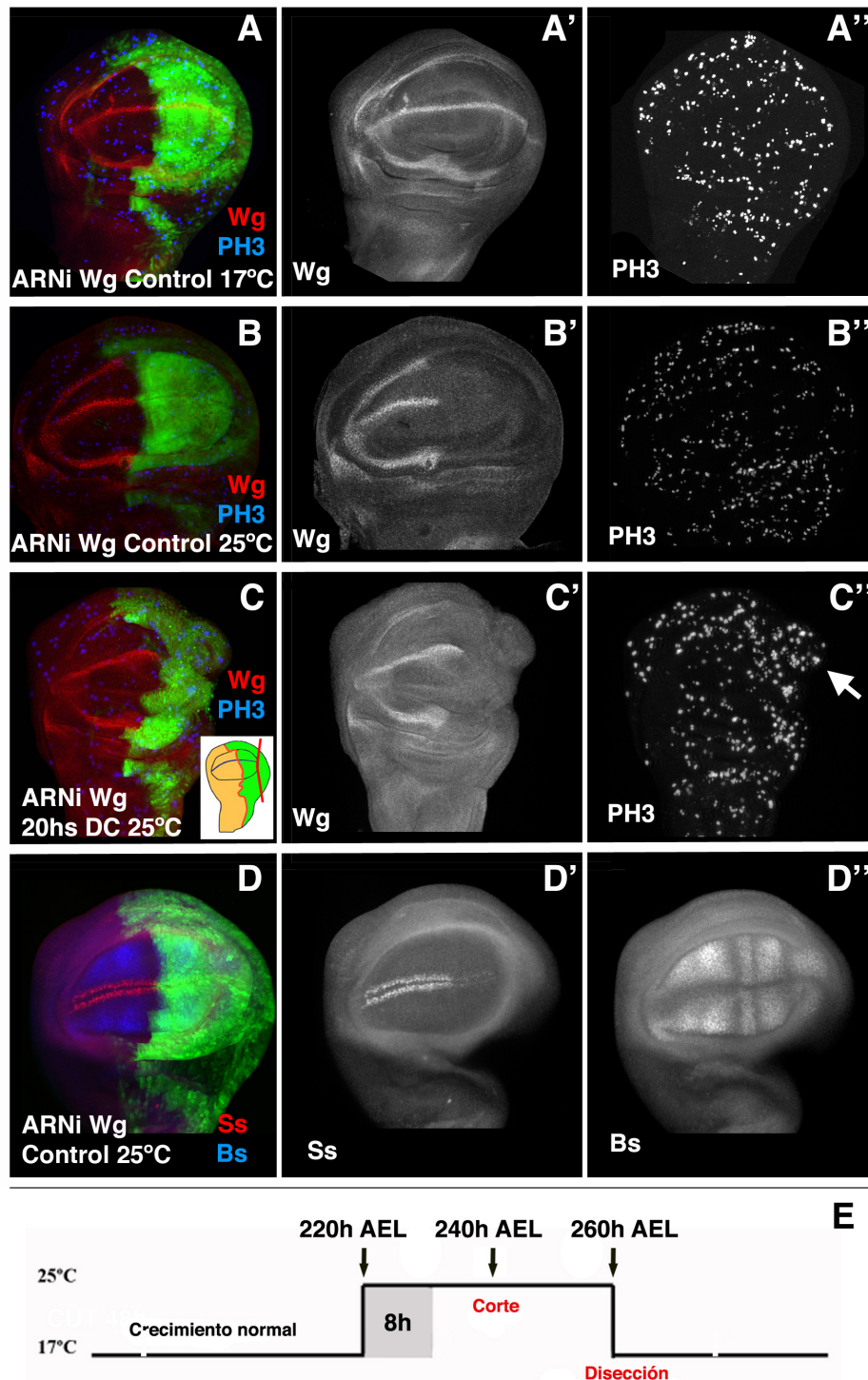


Figura R 17. Análisis de la función de Wg durante la regeneración (A-D''). Discos de ala de larvas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP; UAS- wg^{ARNi}* de tercer estadio larvario teñidos con anti-Wg (en rojo en A, B y C, y en gris en A', B' y C'); anti-Ss (en rojo en D, y en gris en D'). Las células mitóticas fueron marcadas con anti-PH3 (en azul en A-C y en gris en A''-C''). (A-A'') Disco de ala de larvas *en-Gal4 UAS-GFP; UAS- wg^{ARNi}* mantenidas durante todo el desarrollo a 17°C. La expresión de Wg en estos discos es comparable a la de los controles (A'). (B-C'') larvas *en-Gal4 UAS-GFP; UAS- wg^{ARNi}* traspasadas de 17°C a 25°C durante 24 horas antes de la ablación y mantenidas

a esa temperatura durante 24 horas más antes de que se disecaran los discos. Estos discos muestran una fuerte bajada de la expresión de Wg en el compartimiento posterior, tanto en los discos controles (B-B'') como en los cortados analizados 20 hs DC (C-C''). (C-C'') La proliferación celular se incrementó en el compartimiento posterior de los discos en regeneración con niveles indetectables de Wg, como se puede observar en C'' (flecha blanca en C''). (D-D') La expresión de Ss, reportero de actividad de *wg*, desaparece del compartimento P, lo que corrobora el hecho de que no sólo disminuye la expresión de Wg sino también su función. El patrón vena/intervena definido con anti-Bs (en azul en D, y gris en D'') en los discos control no es alterado por la sobre-expresión del *UAS-wg^{ARNi}*. (E) Esquema del protocolo utilizado para eliminar la expresión de *wg*.

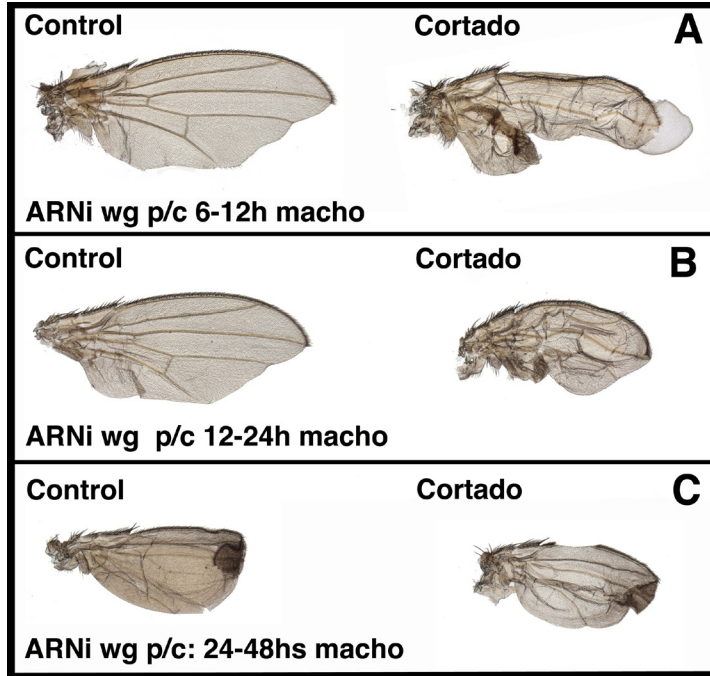


Figura R 18. Alas adultas de moscas *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-wg^{ARNi}* que se cortaron durante el tercer estadio de larva. (A) La larva pupó entre 6 y 12 hs DC. El ala cortada (derecha) tiene una gran muesca que afecta a parte del compartimento posterior. (B) Alas adultas de una larva que pupó entre las 12 y 24 hs DC. El ala cortada (derecha) tiene una muesca que afecta al compartimento P y parte del anterior, y es más redondeada. (C) Alas adultas de larva pupada entre 24 y 48 hs DC. El ala cortada pese a estar redondeada, tiene el mismo tamaño y forma que el ala control, salvo por una pequeña muesca en el compartimento anterior. p/c:pupación con respecto al corte.

DC encontramos que a pesar de la reducción de Wg, el índice mitótico se incrementaba considerablemente en el borde de la herida en el compartimento posterior de discos en regeneración, comparado con discos control (Figura R 17 y R20).

Al igual que ocurría en los discos de genotipo silvestre en regeneración, observamos que en discos de genotipo *en-Gal4 UAS-wg^{ARNi}* crecidos a 25°C, el patrón de vena/intervena, determinado por la expresión de Bs y DI, desaparecía a las 20 horas DC (Figura R 21).

Todos estos resultados sugieren que la disminución en la señalización de *wg* no perturba los procesos de cicatrización de la herida y generación del blastema. Por otra parte, indican que la pérdida del patrón de vena/intervena observado durante la regeneración de los discos imaginales de individuos silvestres, también ocurre en discos de ala con niveles indetectables de *wg* en el compartimento P.

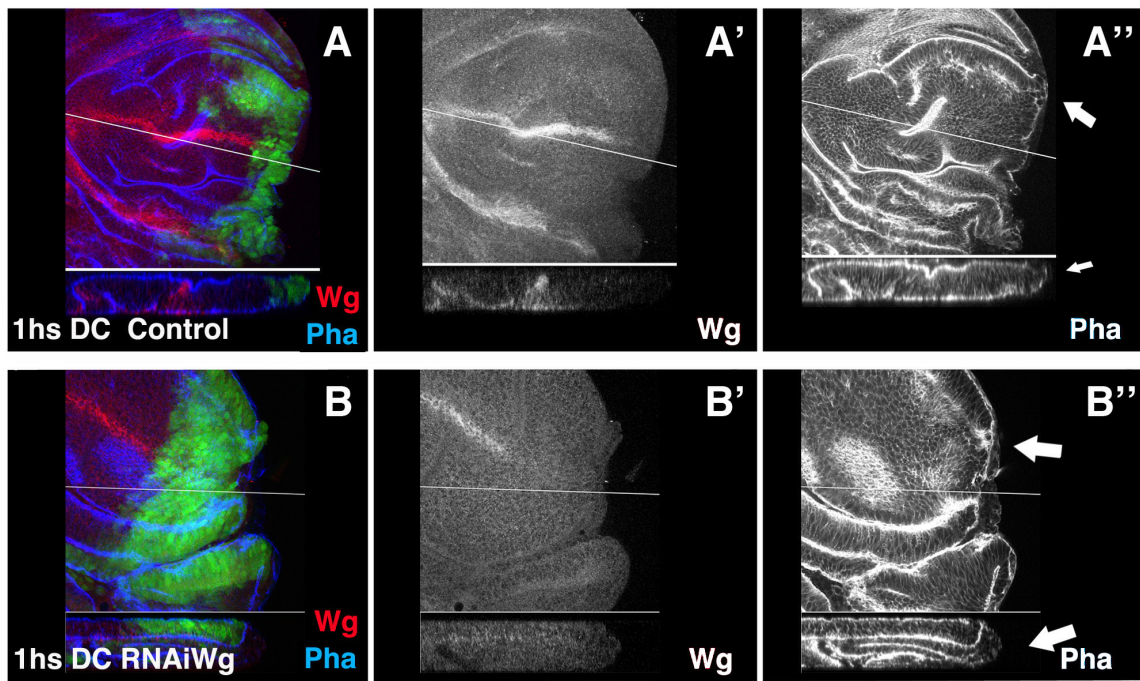
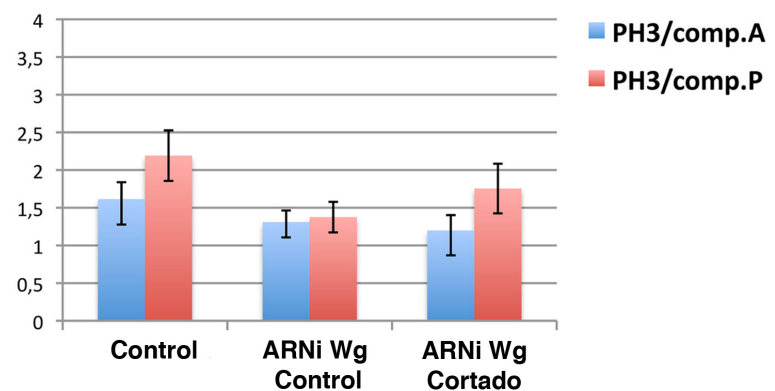


Figura R 19. La función de Wg no es necesaria durante las primeras etapas del proceso de regeneración. (A-B') Discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* teñidos con anti-Wg (en rojo en A, B, y gris en A', B'); anti F-Actina (en azul en A y B, y en gris en A' y B'). (A-B'') larvas *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* traspasadas de 17°C a 25°C durante 24 horas antes de la ablación y mantenidas a esa temperatura durante 1-2 horas más antes de que se disecaran los discos. (A-A'') Los discos mostraron una fuerte bajada de la expresión de Wg en el compartimiento posterior. (B-B'') La tinción de F-actina se incrementó en los bordes de la herida de discos de ala *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* analizados 1-2 hs DC (flecha blanca en B'').

Figura R 20. Índice mitótico en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}*. Los gráficos de barras muestran el promedio del índice mitótico de los compartimentos anterior y posterior de larvas *en-Gal4 UAS-GFP* (Control), y larvas *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* crecidas a 17°C y traspasadas a 25°C durante 48 hr antes de ser disecadas (ARNi Wg Control); discos en regeneración de larvas *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* crecidas a 17°C, mantenidas a 25°C durante 20 hs antes de la ablación y disecadas 20 hs DC (ARNi de Wg Cortado), donde podemos observar que el índice mitótico se incrementó en el compartimento posterior en los discos en regeneración comparado con los discos control.



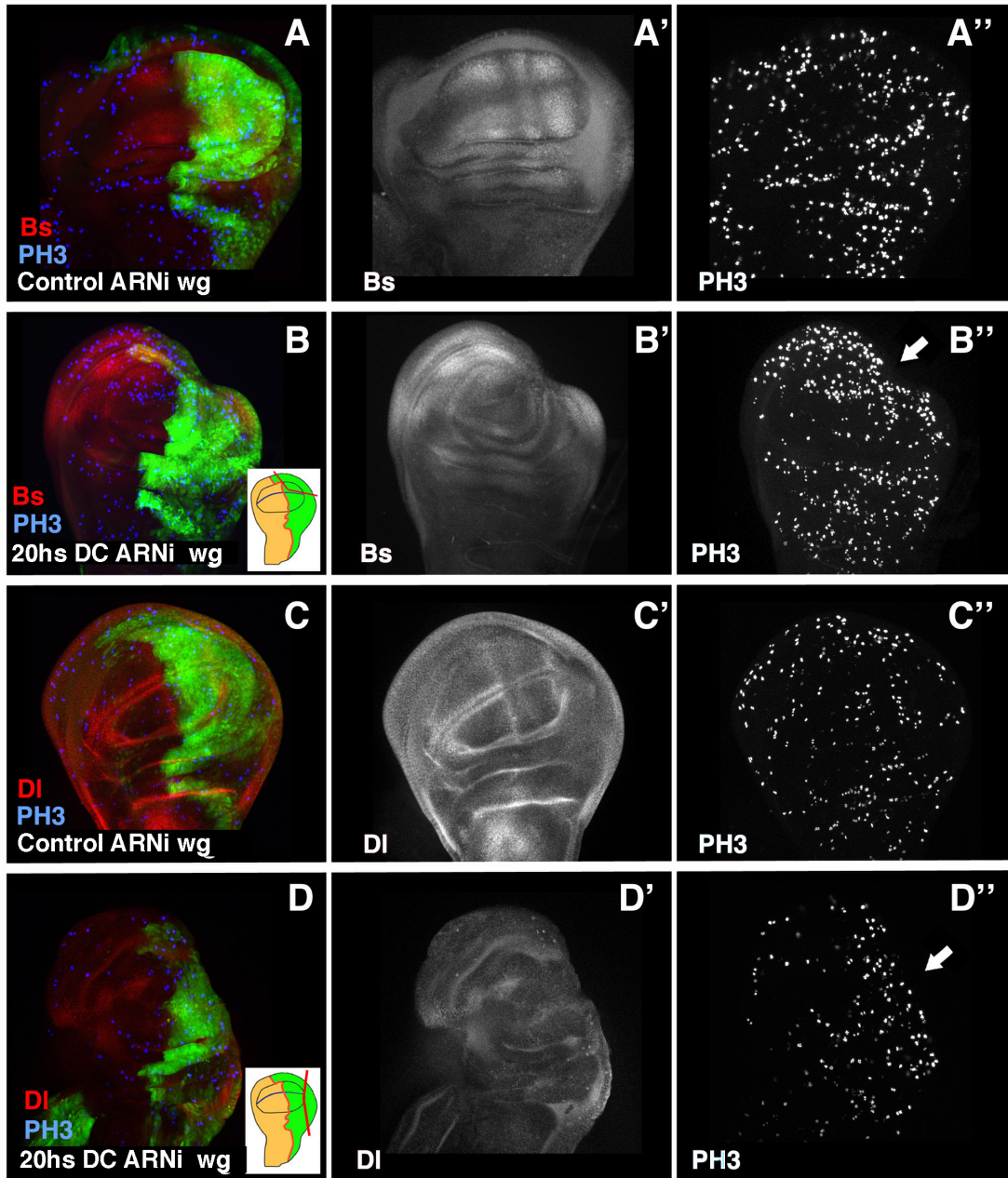


Figura R 21. Los distintos marcadores de patrón en larvas de genotipo *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* siguen la misma evolución durante el proceso de regeneración que larvas de genotipo salvaje. (A-D'') Discos imaginales de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* teñidos con anti-Bs (en rojo en A, B y en gris A', B') y anti-DI (en rojo en C y D, y en gris en C', D'). Las células mitóticas fueron marcadas con anti-PH3 (en azul en A-D y en gris en A''-D''). (B-B'' y D-D'') discos en regeneración de larvas *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* crecidas a 17°C y traspasadas a 25°C durante 24 horas antes de la ablación y mantenidas a esa temperatura durante 24 horas más antes de que se disecaran los discos. (A-A'') El patrón de venas/intervenias definido por Bs (A-A') y DI (C-C') en los discos control, es indistinguible en discos cortados y la expresión de estos factores disminuyó su expresión cerca del borde de la herida en discos *en-Gal4 UAS GFP; UAS- wg^{ARNi}* disecados 20 hs DC (B-B'' y D-D'').

8. Descripción del modelo de regeneración proximo- distal

El hecho de que tanto la expresión del anillo interno como externo de *wg* se restauren antes que su expresión en el borde D/V, sugiere que durante la regeneración las regiones proximales del disco podrían restablecerse antes que las distales. Para examinar esta hipótesis estudiamos la expresión de los marcadores proximales *zfh2*^{LP30} (*zfh2*) (Figura R 22 B-C') y Homothorax (*Hth*) (Figura R 22 E-F') en discos en regeneración. Ambos factores se expresan en discos controles a altos niveles en la región comprendida entre el anillo interno de expresión de *wg* y todo el territorio que dará lugar a la axila (Figura R 22 A'' y D'').

Nuestros datos indican que, transcurridas 20 hs después de la amputación, tanto la expresión de *zfh2* (Figura R 22 C-C'') como la de *Hth* (Figura R 22 F-F'') se restauran completamente en el 64% (n = 20) y 40% (n = 5) respectivamente, de los discos analizados. Sin embargo, en todos estos discos la expresión de *wg* en el borde D/V es aún indetectable en el compartimento P (Figura R 22 C-C''). Cuando el fragmento amputado afecta entre el 30-50% del compartimento posterior encontramos que, tras la restauración de la expresión de estos marcadores, se redefine una región presuntiva de ala significativamente menor que la de los discos contra-laterales controles (Figura R 23), al igual que habíamos observado cuando analizábamos la expresión de *wg* (véase apartado 6 de resultados). Todos estos resultados indican que, durante el proceso de regeneración, las primeras regiones que se especifican son las proximales y posteriormente las regiones correspondientes a la parte más distal del disco.

9. La actividad de la ruta de señalización de Notch se reduce durante los estadios tempranos de la regeneración

Nuestros resultados indican que la expresión transcripcional de *wg* disminuye en el borde D/V durante el proceso de regeneración de los discos imaginales de ala. La expresión de *wg* en este borde depende de la señalización de Notch (N). Coincidiendo con la reducción de *wg*, encontramos que la expresión del reportero de la ruta de Notch, *E(spl)Mβ-CD2*, se reduce en el borde D/V 20 hs DC (Figura R 8 G-G'). Así pues, una explicación plausible para nuestras observaciones es que la pérdida de la expresión de *wg* en el borde D/V durante la regeneración se debiera a una bajada de la actividad de la ruta de Notch.

De acuerdo con esta hipótesis, esperamos que la activación ectópica de la vía de Notch durante la regeneración evite este efecto. Para ello, analizamos la expresión de *wg* durante la regeneración de discos de ala de tercer estadio larvario en los que sobre-expresamos una forma constitutivamente activa de Notch en el compartimento dorsal. Observamos

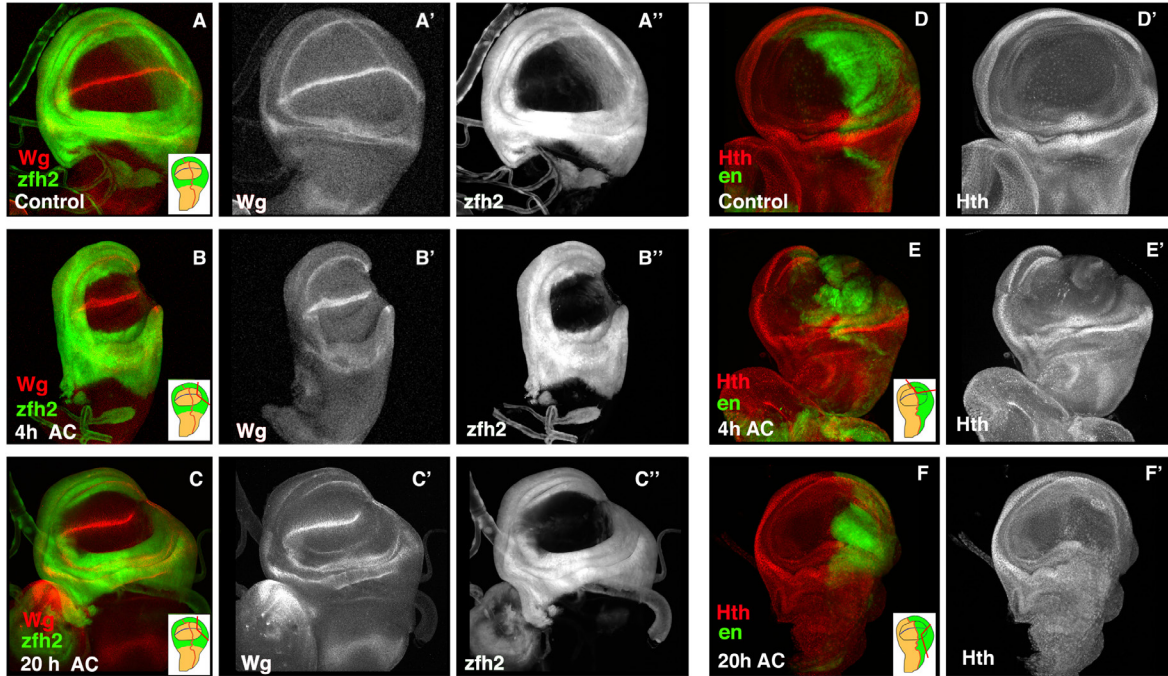


Figura R 22. La expresión de los marcadores proximales *zfh2* y *Hth* se restaura antes de que *Wg* se recupere en el borde D/V. (A-C) Expresión de *UAS-GFP* (en verde) dirigido por la línea *zfh2^{LP30}-Gal4* que se expresa en las regiones proximales de los discos de ala de tercer estadio larvario. La expresión de *Wg* se muestra en rojo (A-C) y gris (A'-C'). (A-A'') Disco control de genotipo *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP*. (D-D') Discos control *en-Gal4 UAS-GFP* teñido con anti-*Hth* (rojo en el D-F, y gris en D'-F'). Durante las primeras 4-5 horas después de la regeneración, ni la expresión de *zfh2* (B-B') ni la de *Hth* (E-E') son alteradas. 20 horas después de la ablación se observó que las expresiones de *zfh2* y *Hth*, así como la del anillo interno de *Wg* fueron restauradas (C,C'' y F-F'), mientras que la expresión de *Wg* continúa ausente del borde D/V (C-C').

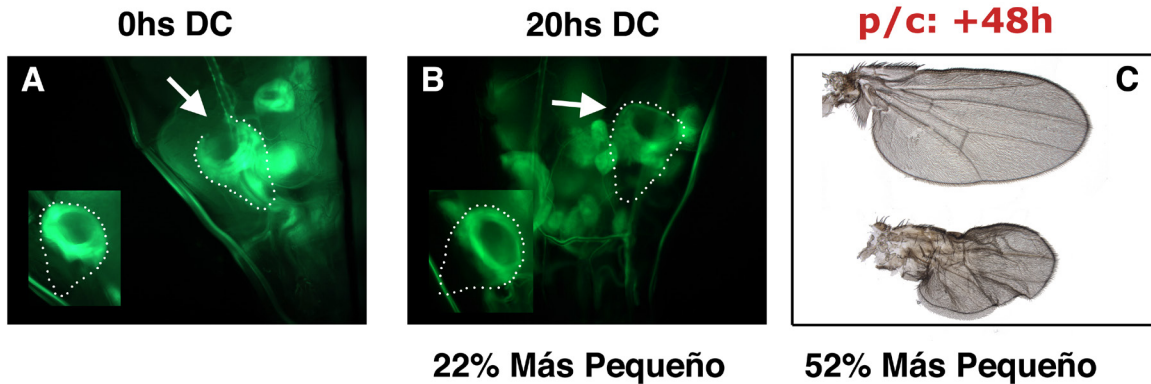


Figura R 23. Imagen de un disco de ala de genotipo *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP* en el momento en el que se infligió el corte (A) y los mismos discos 24 hs más tarde (B), donde se puede observar como se han redefinido las regiones proximales, formando un nuevo territorio presuntivo de ala en el disco, que comparado con el del disco contra-lateral es un 22% más pequeño (la flecha blanca indica el disco regenerado). A la derecha se muestran las alas adultas diferenciadas de estos discos. La larva pupó 48 hs DC.

que en los discos de genotipo *ap-Gal4; UAS-N^{intra}*, Wg aparece a altos niveles en todas las células del compartimento (Figura R 24 A-A'). Cuando realizamos un corte en estos discos encontramos que, transcurridas 20 horas DC, la expresión de Wg no disminuye, y sus niveles de expresión son similares a los observados en los discos sin amputar (Figura R 24 B-B'). Estos datos sugieren que la reducción de *wg* durante la regeneración está causada por una bajada en la actividad de la vía de señalización de Notch.

10. La reorganización del tejido y marcadores de patrón durante la regeneración es independiente de la proliferación celular

Como hemos descrito previamente, durante la regeneración se produce un incremento de la proliferación celular tanto en el borde de la herida como en las regiones adyacentes a ésta (véase apartado 2 de resultados) (Bergantinos et al., 2010). Este proceso sugiere que la proliferación intercalar es necesaria para completar la regeneración. Sin embargo, algunos de nuestros resultados indican que durante la regeneración hay un proceso de reorganización de tejido y patrón que no depende de la división celular. Así, encontramos alas con un patrón de venas relativamente normal que son más pequeñas que las alas control (Figura R 2). Por otra parte, observamos discos de ala en proceso de regeneración en los que se ha redefinido un nuevo territorio presuntivo de ala significativamente menor que el del disco contra-lateral control (Figura R 13, R 14 y R 23). Considerando estas observaciones, decidimos analizar cuál es la contribución de la proliferación celular a los distintos procesos asociados a la regeneración. Con este fin, bloqueamos la división celular sobre-expresando el inhibidor de la Ciclina A *roughex* (*rux*) bajo el control de la línea *en-Gal4*. La función de

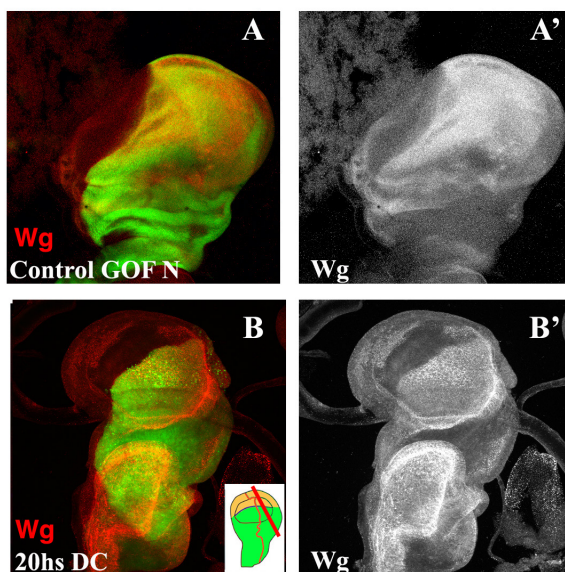


Figura R 24. La expresión de Wg no disminuye durante el proceso de regeneración cuando Notch es sobre-expresado. (A-B') Discos de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP; UAS-N^{intra}* teñidos con anti-Wg (en rojo en A y B y gris en A' y B'). Como podemos observar en el disco cortado 20hs DC (B-B') la expresión de Wg no disminuye, comparada con la que se observa en el disco contra-lateral (Control) (A-A').

esta Ciclina en *Drosophila* es necesaria para la regulación de la transición G2/M. Debido a que la expresión ectópica de *rux* es letal, utilizamos el sistema Gal4-UAS; Gal80^{ts}. Las larvas *en-Gal4-UAS-GFP/UAS-rux ; tub-Gal80^{ts}* se mantuvieron a 17°C durante 240 horas AEL y se pasaron a 29°C durante 24 horas antes de la amputación de un fragmento del compartimento P del disco de ala (Figura R 25 D). La expresión de *rux* bajo el control de *en-Gal4* y en las condiciones descritas, elimina por completo la proliferación celular en los compartimentos posteriores de estos discos, como pudimos observar con el marcador mitótico PH3 (Figura R 26 A-C"). Después de la amputación parcial del disco, las larvas se mantuvieron a 29°C durante 60 minutos para inactivar la expresión de Gal4, con el fin de analizar el proceso de cicatrización de la herida (Figura R 25) y 24 horas más para examinar la expresión de los marcadores de destino celular Wg, Iro y Bs (Figura R 26). Como consecuencia de la parada en G2 producida por *rux* se produce un incremento del tamaño celular, como se observa cuando se compara el tamaño de las células mutantes del compartimento posterior con el de las células control del compartimento anterior (Figura R 26 A-A"). Al igual que ocurre en el caso de los discos imaginales salvajes, se encontró que 60 minutos DC, las células del borde de la herida acumulan altos niveles de F- Actina, como revela la tinción con Faloidina (Pha) (Figura R 25 B-B'). Por otra parte, encontramos que las células de la membrana peripodial se alargaban hacia el epitelio columnar, como se puede observar en la Figura R 25 B, B', esquematizado en el apartado C. En todos los discos analizados se observó que la cicatrización de la herida era comparable con la que se da en los discos cortados control. Todos estos resultados indican que el proceso de cicatrización de la herida ocurre en condiciones en las que se ha bloqueado la división, y que por tanto el proceso de cierre de la herida es independiente de la proliferación celular.

A continuación, analizamos si la reorganización del tejido y del patrón de vena/intervena observado durante la regeneración se producía cuando la proliferación celular era bloqueada. Para ello, examinamos la expresión de Wg, Bs e Iro durante la regeneración de discos de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux / tub-Gal80^{ts}* sometidos al protocolo indicado anteriormente (Figura R 25 D). Observamos que, transcurridas 20 hs DC, en el 77% (n = 9) de estos discos, la expresión del anillo interno de *wg* se encuentra completamente restaurada (Figura R 26 C-C'). De esta manera, se redefine un nuevo territorio presuntivo de ala menor que el de los discos controles, a pesar de que el tamaño de las células que expresan *rux* es mucho más grande que el de las células control. Estos resultados son similares a los encontrados en discos silvestres (Figura R13 C-D'). En concordancia con los resultados obtenidos en discos controles, en el 33% de los discos analizados, la expresión de Wg está considerablemente reducida en el blastema (en el borde D/V) (Figura R 25 C-C"). Por razones que aún desconocemos, también detectamos que en el 55% (n = 9) de los discos *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux / tub-Gal80^{ts}* analizados, Wg se expresa ectópicamente en algunas

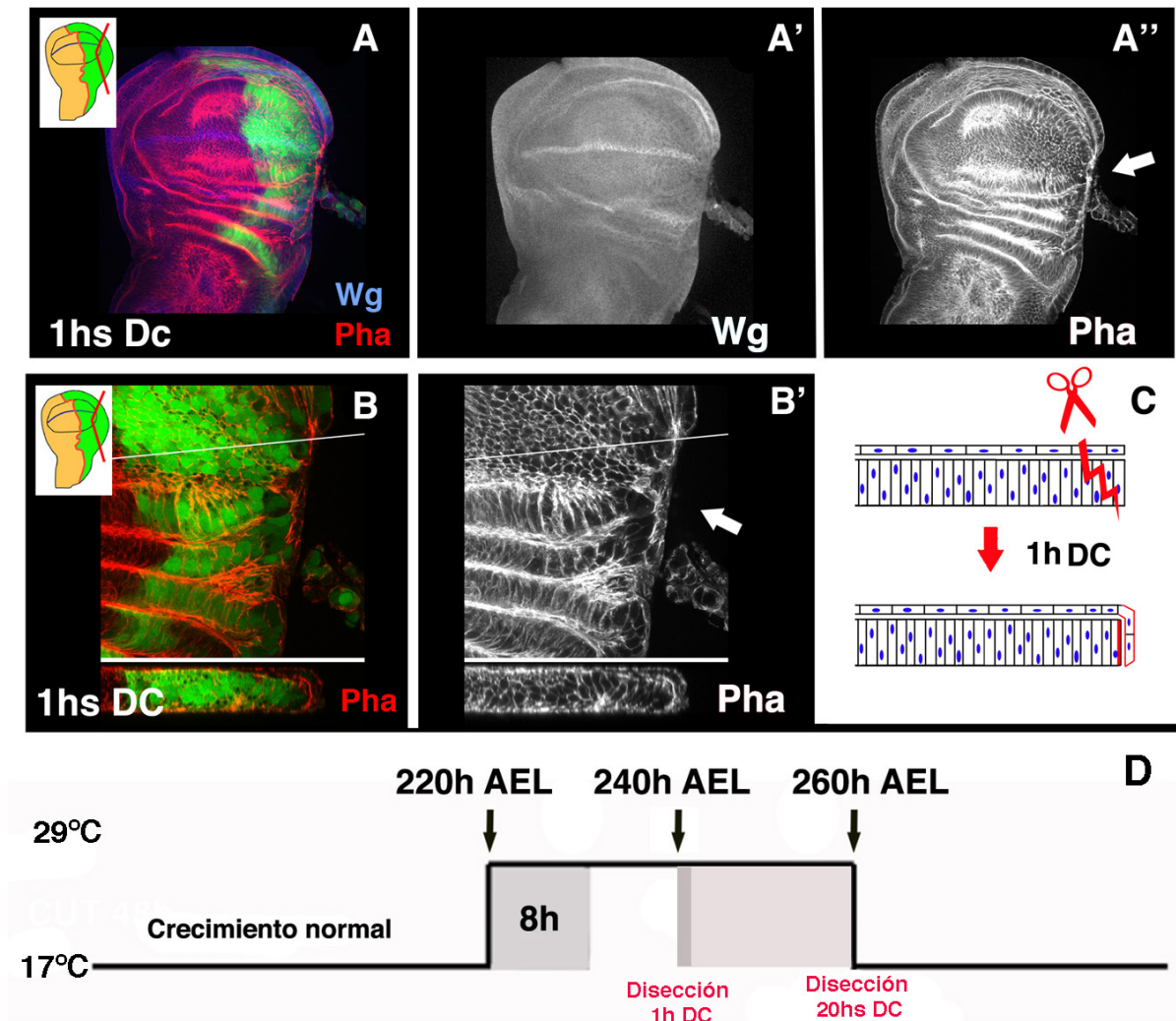


Figura R 25. El proceso de cicatrización no se ve alterado durante la regeneración en ausencia de proliferación celular. (A-B') Discos de tercer estadio larvario de larvas de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux / tub-Gal80^{ts}* mantenidos a 17°C y traspasados a 29°C durante 24 horas antes de la ablación. Tras la amputación se mantuvieron a 29°C durante 60 minutos más para examinar la expresión de faloidina (rojo en A y B, y gris en A'' y B') y anti-Wg (azul en A y gris en A'). Nótese que la sobre-expresión de *rux* durante 24 hs en larvas *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux / tub-Gal80^{ts}* da lugar a un incremento del tamaño en las células del compartimento posterior de estos discos. (A-A'') Al igual que ocurre durante el proceso de regeneración en los discos control, 1 hora después del corte observamos un incremento de F-Actina en el borde de la herida. (B-B'') Imagen tomada a mayor aumento del borde de la herida, y corte transversal en el eje Z. Encontramos que la integridad del epitelio se ha restablecido. (D) Esquema del protocolo utilizado para bloquear la proliferación celular durante la regeneración.

células del compartimento posterior. Esta expresión ectópica de Wg podría ser causada por la detención del ciclo celular y/o activación de la muerte celular causada por la expresión ectópica de *rux*.

Resultados

La evolución del patrón de expresión de los marcadores de patrón de vena e intervena en discos ablacionados de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux / tub-Gal80^{ts}* es muy similar a la previamente descrita para discos controles de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP*. Así, encontramos que transcurridas 20 hs desde la amputación, se produce una bajada de la expresión de Iro y Bs en la regiones presuntivas de vena e intervena respectivamente (Fig. R 27 B-B'' y D-D''). Al igual que ocurría en los discos silvestres este descenso es siempre evidente en las células del compartimento posterior y únicamente se observa en células del compartimento

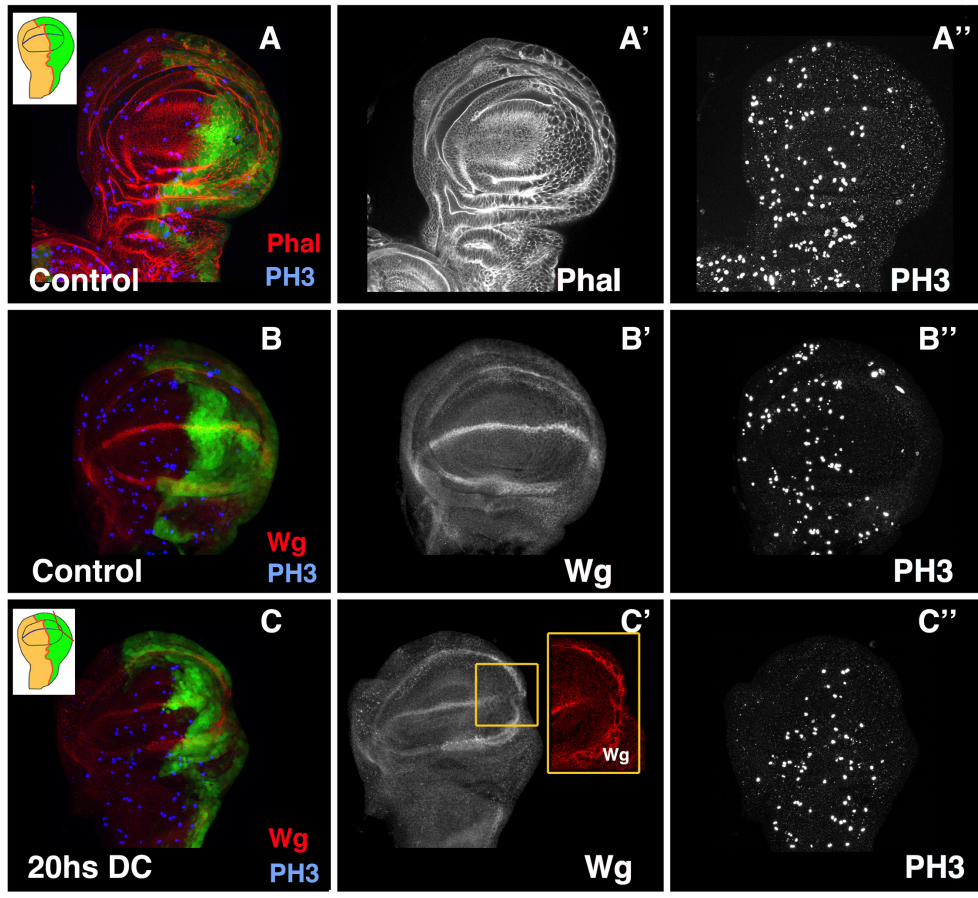


Figura R 26. Expresión de Wg durante el proceso de regeneración en ausencia de proliferación celular. (A-C'') Los discos de tercer estadio larvario de larvas de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux/tub-Gal80^{ts}* mantenidos a 17°C fueron transferidos a 29°C durante 24 horas antes de la ablación y se mantuvieron a 29°C durante 24 horas más tras la ablación, para examinar la expresión de Wg en ausencia de división celular. Los discos fueron teñidos con anti-Wg (en rojo en A, B, C, y en el recuadro amarillo en C' y en gris en A', B', C'') y anti-PH3 (en azul en A-C y en gris en A'-C''). (A-B'') Nótese el gran tamaño de las células que expresan *rux*. La proliferación celular se detuvo en los compartimentos posteriores de estos discos. (C-C'') Al igual que ocurre durante el proceso de regeneración en los discos imaginarios de genotipo salvaje, 20 horas después del corte observamos que la expresión de Wg desaparece cerca del borde de la herida a lo largo del borde D/V (área ampliada en el recuadro amarillo en C'), mientras que la expresión del anillo interior de Wg se ha restablecido.

anterior cuando la región eliminada es mayor del 40% del compartimento P del disco. La pérdida de compromiso de destino celular se confirmó por la ausencia de *Iro*, que en discos controles se expresa en las células presuntivas de vena L3, L4 y L5 (Figura R 27 A-A''). La expresión de este marcador se reduce en todos los casos de forma significativa en la región correspondiente a las venas L4 y L5, que son las que diferencian en el compartimento posterior.

Intentamos analizar el patrón de alas adultas derivadas de moscas de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux/ tub-Gal80^{ts}* tras el proceso de regeneración. Para ello transferimos estas larvas a 29°C durante 24hs antes de la amputación y las mantuvimos a esa temperatura durante todo el desarrollo. Desafortunadamente estas larvas morían durante el desarrollo pupal. Curiosamente, cuando a las mismas larvas no se les amputaba un fragmento del disco, conseguíamos recuperar individuos adultos cuyas alas eran significativamente menores que las alas control, ya que el compartimento posterior estaba fuertemente reducido. No conocemos las razones de estas divergencias, pero podría deberse a que la combinación de dos condiciones dañinas para la larva, como son el daño producido por el corte y la sobre-ex-

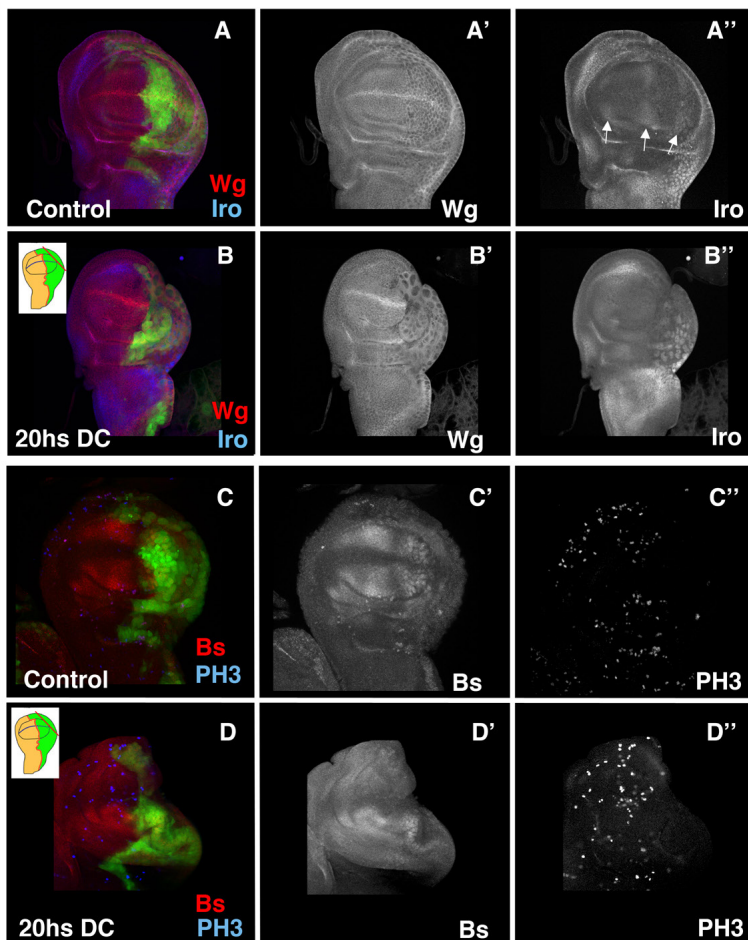


Figura R 27. Análisis de distintos marcadores de patrón durante el proceso de regeneración en ausencia de proliferación celular. (A-E'') Discos de tercer estadio larvario de larvas *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-rux ; tub-Gal80^{ts}* mantenidos a 17°C y traspasados a 29°C durante 24 horas antes de la ablación. Posteriormente se mantuvieron a 29°C durante 24 horas más para examinar la expresión de *Iro* y *Bs*. (A-D'') Los discos fueron teñidos con anti-Wg (en rojo en A, B y en gris en A', B'), anti-Iro (en azul en A y B, y en gris en A'' y B''), anti-Bs (en rojo en C y D, y en gris en C' y D'), y anti-PH3 (en azul en C, D y en gris en C''-D''). (A-D'') El patrón de vena/ intervena definido por la expresión restringida de *Iro* en las venas (flechas en A'') y *Bs* en el territorio de intervena (C-D''), desaparece en discos en regeneración disecados 20 hs DC (B-B'' y D-D'') incluso aun que la proliferación celular se ha detenido durante el proceso de regeneración, analizados 20 hs DC.

presión de *ruv*, podrían dar lugar a animales enfermos que morirían prematuramente.

Todos estos resultados sugieren que la pérdida de compromiso de destino celular que se produce en el disco tras la ablación y la reorganización del tejido que tiene lugar durante la regeneración, es independiente del incremento de la división celular.

11. Descripción de la reorganización de tejido durante la regeneración

Nuestros datos indican que durante la regeneración del disco de ala tanto la expresión del anillo interno de *wg* como la de los marcadores proximales *zfh2^{LP30}* (*zfh2*) y Homothorax (*Hth*) se restauran antes que la expresión de *wg* en el borde D/V (Figura R 23 C-C'' y F-F'). Esto da lugar a que se defina una nueva región presuntiva de ala de menor tamaño que la observada en discos controles (Figura R 13 D-E' y R 24). Esta reorganización del disco podría explicar el origen de las alas adultas regeneradas que presentan un patrón relativamente normal pero que son menores que las alas control. Así, estas alas podrían derivar de discos en los que se hubiera redefinido una nueva región presuntiva de ala pero que no hubieran tenido tiempo de completar la regeneración.

Para demostrar esta idea documentamos a distintos tiempos, desde el momento del corte hasta el adulto, el proceso de regeneración de discos individuales *zfh2^{LP30}-Gal4 UAS-GFP* a los que habíamos amputado un fragmento del compartimento posterior (Figura R 28 A). Con el fin de definir el fragmento eliminado y el tamaño de la región presuntiva de ala remanente, fotografiábamos los discos a través de la cutícula larvaria inmediatamente después de la amputación. Transcurridas 20 hs, volvíamos a fotografiar los mismos discos. A esta edad, constatamos que la expresión de *zfh2* estaba totalmente restaurada en el 73% ($n = 13$) de los discos analizados. El tamaño de las nuevas regiones presuntivas de ala que se redefinían tras la amputación eran siempre más pequeñas que la de los discos contra-laterales control. Estos tamaños oscilaban desde una reducción menor del 10%, cuando el fragmento eliminado había sido menor del 30% del compartimento P, a más del 50% cuando el fragmento eliminado era más grande ($> 40\%$ de P compartimento) (Figura R 28). Las alas adultas derivadas de discos que 20 hs después del corte mostraban una región presuntiva de ala significativamente menor que los controles ($> 20\%$ más pequeño), o bien eran más pequeñas que los controles pero con un patrón normal (28%, $n = 7$) (Figura R 23), o tenían muescas en el compartimento posterior o en ambos compartimentos (57%, $n = 7$) (Figura R 27). Los discos en los que la expresión de *zfh2* no se restableció 20 hs DC, siempre diferenciaban alas vestigiales o muñones (Figura R 27). Estos resultados indican que las alas más pequeñas pero con patrón normal derivan de discos amputados en los que la especificación de la región proximal ha redefinido un nuevo territorio presuntivo de ala.

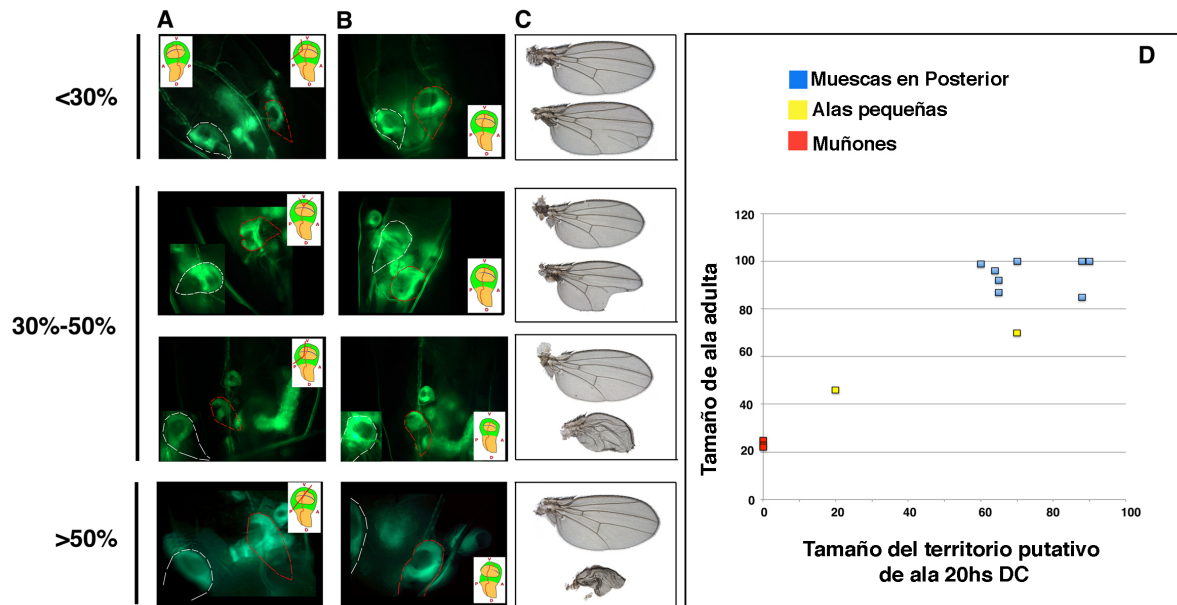


Figura R 28. Evolución de la expresión de *zfh2*^{LP30}-Gal4 UAS-GFP durante la regeneración del disco de ala. Imagen de diferentes ejemplos de discos amputados 48 hs antes de la formación de pupario. (A) Imágenes tomadas inmediatamente después del corte (0 h DC). Para facilitar la interpretación de las imágenes, los discos amputados se han delimitado por una línea roja, mientras que los controles (discos contra-laterales) se han delimitado por una línea blanca. En las ilustraciones se muestra un esquema indicando la región amputada en cada caso. (B) Imágenes de los discos amputados mostrados en A, pero 24 hs más tarde. En estas imágenes se puede observar el tamaño reducido de la región presuntiva del ala (definido por la expresión de *zfh2*) en los discos cortados (delimitados en rojo) en comparación con el disco contralateral control (delimitados en blanco). (C) Alas adultas derivadas de los discos mostrados en A y B. El ala superior de cada recuadro corresponde al corte infligido inicialmente, y la inferior corresponde al mismo disco transcurridas 24 hs. (D) Gráfico en el que se representa el tamaño del territorio presuntivo del ala en los discos 20 hs DC (eje X), en relación con el tamaño de las alas adultas diferenciadas de esos mismos discos (eje Y). Como referencia, se midieron los tamaños de los territorios presuntivos de ala en los discos y la alas adultas contra-laterales, a las que se otorgó un valor de 100%. Los cuadrados rojos indican los discos en los que la expresión de *zfh2*^{LP30}-Gal4 UAS-GFP no estaba restaurada 20 hs DC. Los cuadrados amarillos representan alas pequeñas con un patrón de diferenciación normal y los azules alas con muescas que sólo afectaron al compartimento posterior.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que durante la regeneración, además de producirse un aumento en la proliferación, es también necesario que se produzca una reorganización de tejido para que se complete el proceso de regeneración.

12. Plasticidad del disco imaginal de ala

Nuestros datos indican que el tamaño de la región presuntiva de ala se puede reajustar cuando parte de esta región es eliminada. Esto sugiere que existe una gran plasticidad en el disco y que deben existir re-organizaciones de tejidos durante el proceso regenerativo. Analizamos si este efecto también se producía cuando una gran región del disco de ala

Resultados

era eliminada genéticamente. Para lograr este objetivo, bloqueamos la división celular en el compartimento P mediante la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa del Factor del Retinoblastoma (RbF) bajo el control de *en-Gal4*. Las larvas de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP* ; *UAS-Rbf280/tub-Gal80^{ts}* fueron mantenidas a 25°C hasta las 96 hs AEL y luego fueron traspasadas a 29°C para bloquear la división celular (Figura R 29 A). El tamaño del compartimento P se redujo considerablemente en comparación con el compartimento anterior después de 48 horas a 29°C (Figura R 29 C). Transcurridas 24 horas más (72 horas a 29°C), el compartimento P de la mayoría de estos discos se eliminó por completo y sólo

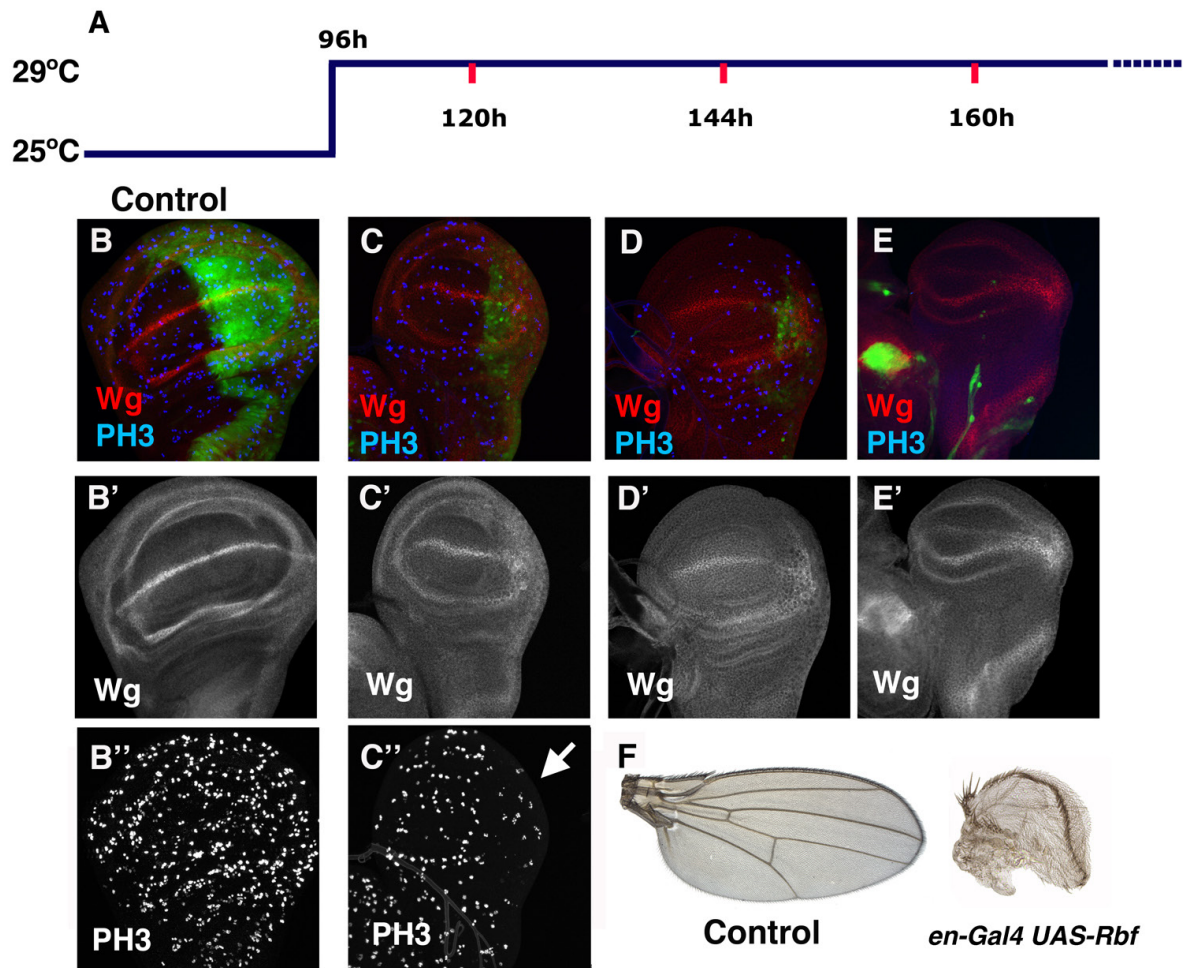


Figura R 29. Estudio de la plasticidad en los discos imaginales. (A) Las larvas de genotipo *en-Gal4-UAS-GFP>UAS-Rbf²⁸⁰/tub-Gal80^{ts}* se mantuvieron a 25°C hasta 96hs AEL, momento en el que transfirieron a 29°C. Los discos se tiñeron con anti-Wg (en rojo B-E y en gris en B'-E') y anti-PH3 (en azul en B-D y en gris (B''-C'')). (B-B'') Disco de larva *en-Gal4 UAS-Rbf²⁸⁰ UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}* crecida a 25°C, que muestra un patrón de proliferación normal. (C-E) Discos de ala *en-Gal4-UAS-GFP; UAS-Rbf²⁸⁰/tub-Gal80^{ts}* después de 24 horas (C-C''), 48 horas (D-D') y 72 horas (E-E') a 29°C. Existe una fuerte reducción del número de células mitóticas en el compartimento P de los discos de mutantes, como pone de manifiesto la tinción con PH3 (comparar B'' con C''). (F) Ala adulta de una mosca control y de moscas *en-Gal4-UAS-GFP/ UAS-Rbf²⁸⁰/tub-Gal80^{ts}* que se traspasaron a temperatura restrictiva 96hs AEL y se mantuvieron a esa temperatura hasta el final del desarrollo.

observamos un pequeño grupo de células residuales que expresaban GFP (Figura R 29 D). Sorprendentemente, encontramos discos en los que la expresión del anillo interno de *wg* redefinía un nuevo territorio presuntivo de ala mucho más pequeño que la misma región de los discos controles (> 50% menor) y formado mayoritariamente por células anteriores (Figura R 29 E-E'). Las alas adultas que evaginaron a partir de estos discos fueron aproximadamente la mitad del tamaño de un ala normal, y sus elementos de patrón fueron característicos del compartimiento anterior (Figura R 29 F).

Estos resultados junto con los anteriormente mostrados sugieren que durante el desarrollo, existe una alta plasticidad en las células de los discos, de manera que, cuando una parte significativa de estos es eliminada, se pueden poner en marcha mecanismos que son capaces de inducir una reorganización del tejido restante.

13. Análisis de los cambios epigenéticos durante la regeneración

Nuestros resultados sugieren que la reducción de los niveles de Wg durante la regeneración se debe a una bajada de actividad de la ruta de Notch, cuyo papel en el disco de ala es fundamental para el crecimiento y la correcta formación del patrón del ala adulta. Aún desconocemos las causas de la bajada de actividad de esta ruta de señalización. El hecho de que la expresión de *ap* no se modifique de forma significativa en discos amputados, indica que la confrontación entre células dorsales y ventrales ocurre con normalidad. Este proceso es fundamental para la activación de la ruta de Notch en el margen. Por lo tanto, la reducción de esta ruta no parece deberse a la desaparición del borde D/V. Uno de las rutas que se activan durante el proceso de regeneración es la de JNK (Bosch, Serras et al. 2005; Lee, Maurange et al. 2005). Se ha descrito que esta vía de señalización puede modular la función de las proteínas del grupo Polycomb (Lee, Maurange et al. 2005). Así, una posibilidad es que la actividad de la ruta de Notch y otros genes que cambian su expresión durante la regeneración, puedan estar regulados por procesos epigenéticos. Para examinar si la actividad de las proteínas del grupo Polycomb se modifica durante la regeneración, analizamos la expresión del gen *posterior sex comb* (*psc*) en discos amputados. La expresión de este gen puede ser usado como un reportero de la actividad de este grupo de proteínas. Para realizar este análisis, amputamos discos imaginales de ala de larvas de la línea *rotund-Gal4 UAS-GFP; pscQF QUAS-RFP* y los analizamos 20 hs DC (Figura R 30). Se analizó la expresión del reportero *psc* por la presencia de RFP, observándose una bajada en su expresión (Figura R 30 B-B'). Este resultado, sugiere que PcG podría estar involucrado en la regulación de la expresión de distintos genes que operan durante el proceso de regeneración (Figura R 30).

Resultados

Considerando los resultados anteriormente descritos, decidimos examinar mediante PCR cuantitativa si los niveles de expresión de distintos genes que codifican para factores que afectan la regulación epigenética, estaban alterados durante el proceso regenerativo. Para ello, comparamos la expresión de genes del grupo Polycomb y Trithorax presentes en discos en regeneración a las 20-24 hs DC, comparados con discos contra-laterales control.

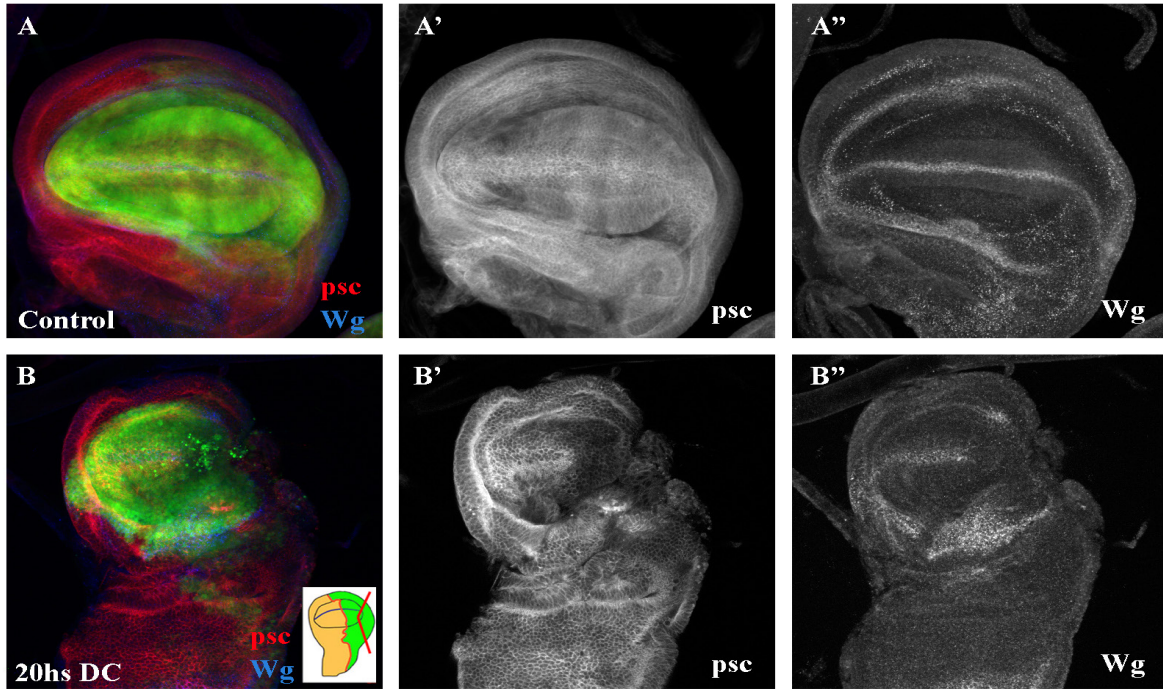


Figura R 30. El gen reportero *psc* de la actividad de PcG, disminuye en el compartimento P a las 20hs DC. Análisis de la expresión de *Wg* (en azul en A, B y en gris en A' y B'') y *psc* (en rojo en A, B y en gris en A' y B') en disco control (A-A'') y cortado estudiado 20hs DC (B-B'').

También incluimos en nuestro análisis genes cuya expresión hemos observado que cambia durante la regeneración. El ensayo fue llevado a cabo por triplicado usando 60 discos cortados y sus respectivos 60 discos contra-laterales como control. Los discos amputados fueron seleccionados de manera que en todos se hubiera eliminado una fragmento de tamaño similar.

El resultado del experimento no fue concluyente, ya que no encontramos cambios significativos en los niveles de expresión de Polycomb y Trithorax y tampoco observamos variaciones en los niveles de los transcritos de genes cuya expresión hemos comprobado que cambian durante la regeneración. Este resultado, podría deberse a que el número de células en las que se modifica la expresión de los genes analizados durante la regeneración

es relativamente pequeño en comparación con el número de células de todo el disco (Figura R 31). De esta manera, los cambios en los niveles de expresión de los genes que pudieran estar modificándose como consecuencia de la regeneración no se podrían detectar con esta metodología.

En conclusión, a pesar de que algunos de nuestros resultados sugieren que durante la regeneración pueden operar mecanismos de regulación epigenética, no hemos podido determinar qué genes podrían estar implicados en este proceso mediante amplificación por qPCR.

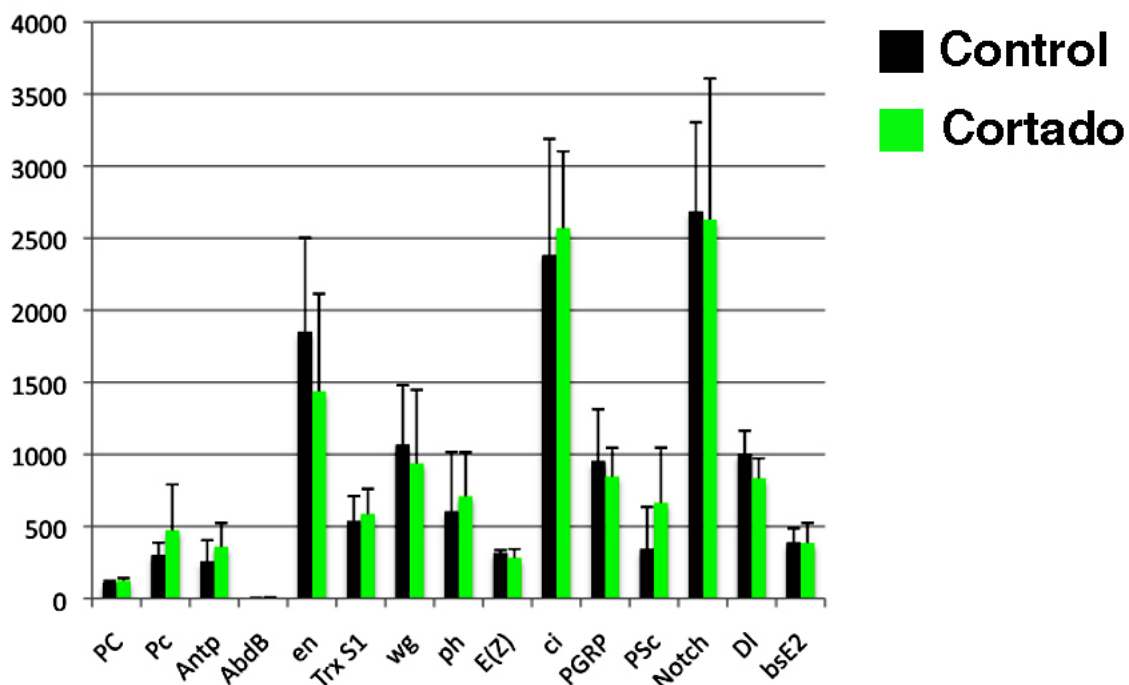


Figura R 31. Cuantificación por qPCR de los niveles de expresión de los genes PC, polycomb, antennapedia, abdominal B, engrailed, trithorax S1, wingless, polihomeotic, E(Z), cubitus interruptus, pgrp, posterior sex comb, Notch, Delta y bsE2, tanto en discos controles (barras negras) como en cortados (barras verdes). Los resultados obtenidos de la amplificación de estos genes se normalizaron frente a la expresión del gen de expresión constitutiva rp49. No se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de discos.

14. Estudio de la implicación de diferentes rutas de señalización implicadas en la regeneración del disco imaginal de ala en *Drosophila*

Los resultados presentados en este trabajo indican que durante la regeneración de los discos de ala se inician diferentes procesos que no sólo afectan a las células cercanas al borde de la herida, sino que estos efectos también pueden extenderse a gran parte de las células del resto del disco. Estos resultados sugieren la existencia de una o varias señales que se activan cerca de la herida y que son capaces de señalizar al resto del disco. Estudios previos, han demostrado que varias vías de señalización, tales como la vía de las JNK, la vía de las JAK/STAT, y la vía de Hippo-Salvador-Warts (HSW), se activan durante el proceso de regeneración. Utilizando nuestra metodología hemos verificado que todas estas rutas se activan en el disco de ala entre 24-48 hs después de la amputación (Figura R 32 y datos no mostrados). Como previamente había sido descrito, encontramos que la activación de estas rutas no sólo se restringe a las células de los bordes de la herida, sino que puede extenderse por distintas áreas de la región presuntiva del ala (Figura I 10-I 12, R 32 y R 33).

Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que algunos de los procesos que ocurren durante la regeneración, tales como la reorganización del tejido y del patrón y/o la inducción de la muerte celular (tanto autónoma como no autónoma), pudieran deberse a la acción de estas señales o combinación de varias de ellas. Para estudiar esta hipótesis hemos activado de forma ectópica y por un tiempo limitado estas rutas de señalización y hemos analizado si son suficientes para reproducir algunos de los procesos que ocurren durante la regeneración. Con este fin sobre-expresamos diferentes miembros de estas vías de señalización, utilizando el sistema Gal4/Gal80^{TS} bajo la regulación de *patched-Gal4* (*ptc-Gal4*), que se expresa en una banda longitudinal de células a lo largo del borde A/P, y analizamos a distintos tiempos los efectos provocados por la activación ectópica de estas rutas.

En resumen, en los apartados anteriores hemos mostrado una serie de procesos asociados a la regeneración, entre ellos un incremento de apoptosis cerca del borde de la herida, y también en células alejadas del sitio del corte, incluso en el compartimento anterior. Por otro lado, encontramos que de forma consistente, la expresión de *wg* en el borde D/V se pierde tanto en la zona de la herida como en regiones adyacentes. En otras áreas del disco, como en la regiones proximales, la expresión de *wg* no se modifica. Por último, nuestros datos indican que durante la regeneración hay una pérdida temporal de marcadores de patrón vena/intervena, como observamos analizando la expresión de Bs y DI. Estos efectos son bastante reproducibles y consistentes, por lo que decidimos estudiar si la activación ectópica de las distintas rutas analizadas reproducían los cambios en la expresión de *wg*, DI y el incremento de apoptosis, tanto autónoma como no autónoma, que encontramos durante la regeneración.

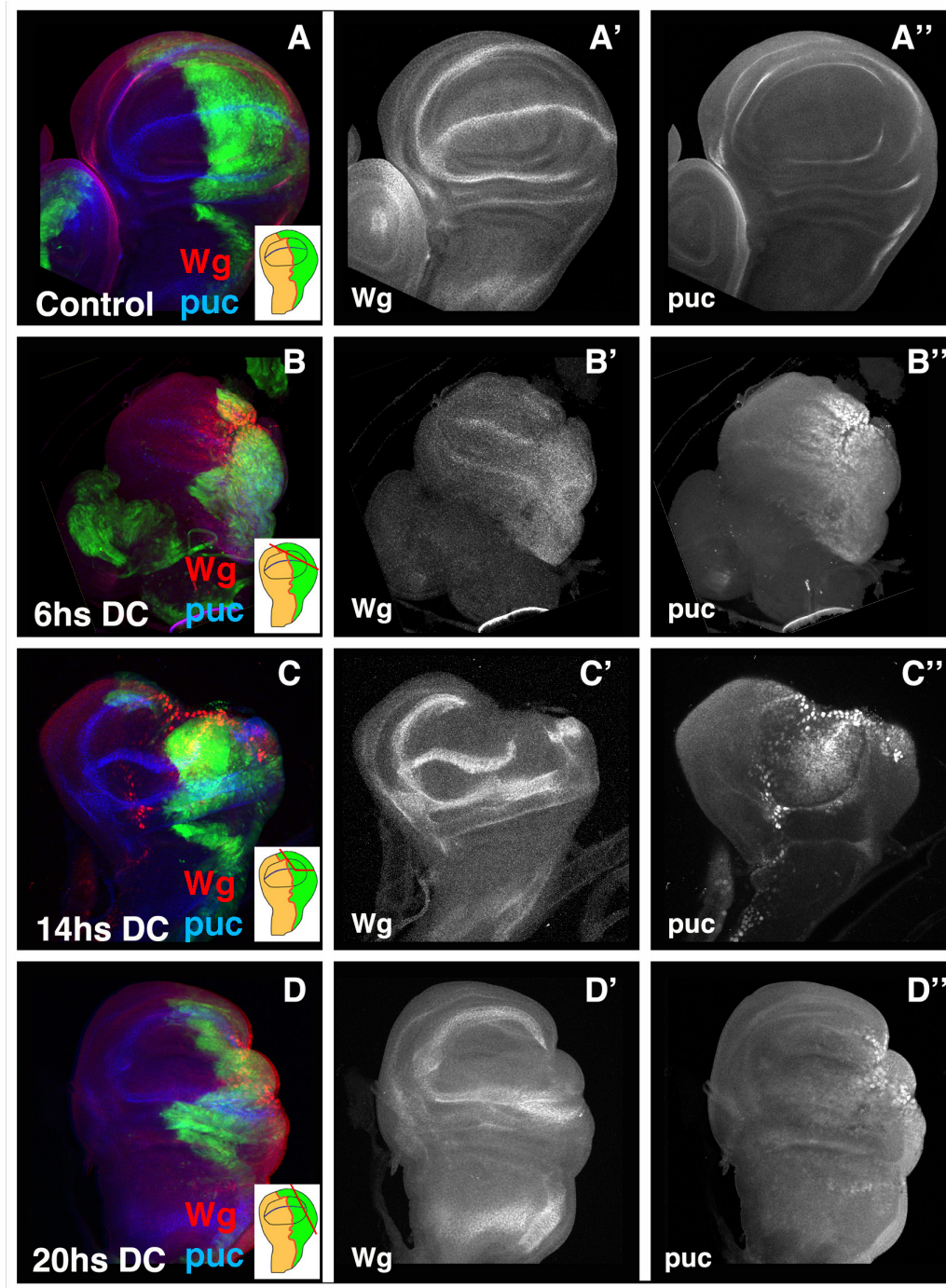


Figura R 32. Activación de la vía de las JNK durante el proceso de regeneración. Discos de larvas de genotipo en-Gal4 UAS-GFP, *puc*^{E69} teñidos con anti-Wg (en rojo en A-D y en gris de A'-D'), anti-βGal, que revela la actividad del reportero *puc*^{E69} (en azul en A-D y en gris en A''-D''). (A-A'') La ruta de las JNK no se activa durante el desarrollo normal de los discos, sin embargo, cuando se inflige un corte, se activa en el borde de la herida a las pocas horas (B-B''), y se extiende por el resto del disco (C-C'') permaneciendo activa 24 hs DC en regiones cercanas al borde de la herida (D-D''). En las figuras A-D, se muestra una ilustración que esquematiza el tipo de corte que se infligió en cada caso.

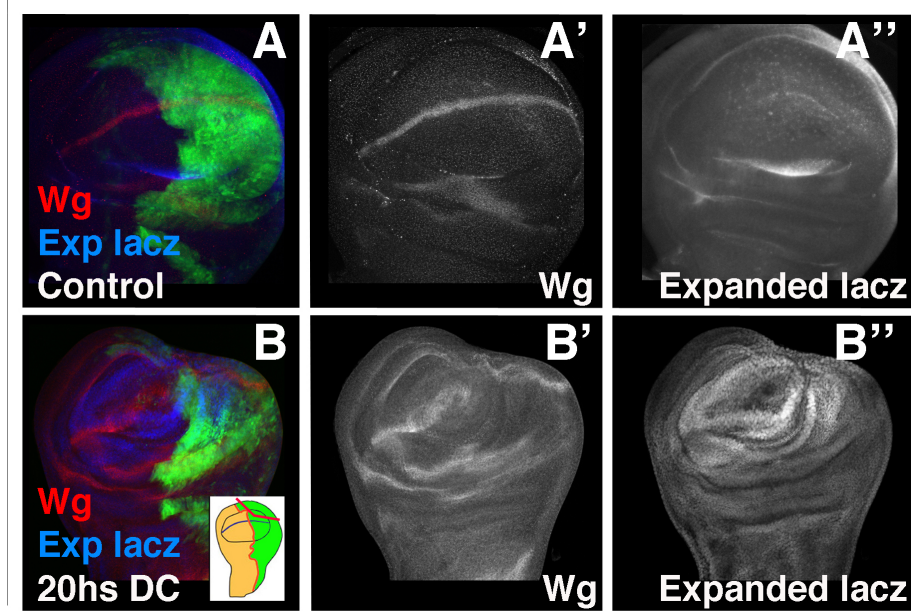


Figura R 33. Expresión de la ruta de HSW durante la regeneración. Discos de larvas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP, ex-lacZ* teñidos con anti-Wg (en rojo en A-B y gris de A'-B') y anti-βGalque revela la actividad del reportero *ex-lacZ* (en azul en A-B y en gris A''-B''). Cuando se inflige un corte, los niveles de activación de la ruta son más elevados que en discos controles (comparar B'' con A'').

La activación ectópica de las distintas rutas analizadas se indujo sobre-expresando los siguientes genes: para la ruta de JNK sobre-expresamos *eiger* (el ligando de la ruta) y *hemipterous* constitutivamente activo (*hep^{CA}*) (una de las quinasas efectoras de esta vía); para la activación ectópica de las JAK/STAT sobreexpresamos *upd* (citoquina difusible de esta ruta) y *hopscotch tumorogénesis* (*hop^{tum}*, una forma de la quinasa JAK constitutivamente activa). Por último sobre-expresamos *yorkie* (*yki*) para la activar de manera ectópica la ruta de HSW. Estas rutas fueron activadas transfiriendo larvas de tercer estadio larvario de genotipo *ptc-Gal4 UAS-GFP, tub-Gal80^{TS} UAS-X* (donde X representa los distintos miembros de cada ruta analizados) a 29°C durante 24 hs. Tras este periodo, las larvas fueron diseccionadas inmediatamente (R0), o se mantuvieron a 25°C durante 24 hs (R24) o 48 hs (R48) más tarde (Figuras R34-37).

En ningún caso y a ninguno de los tiempos analizados observamos que la expresión de Wg se modificara ni dentro ni fuera del dominio de expresión de *ptc*. Cuando analizamos la expresión de DI, encontramos resultados similares, ya que su expresión no se veía afectada de forma significativa (datos no mostrados).

Los resultados presentados en este trabajo indican que la sobre-expresión del ligando *eiger* de las JNK y de las citoquinas *upd* de la ruta JAK-STAT producen un incremento autónomo y no autónomo de la muerte celular. En ambos casos observamos un incremento considerable de la muerte celular fuera del territorio de sobre-expresión de dichos

genes.

Previamente había sido descrito que ambas rutas se activan en el borde de la herida y que son capaces de enviar señales al resto del disco (Bosch et al., 2008)(Pastor-Pareja et al 2008). Según nuestros resultados, Eiger y Upd podrían estar implicados en la señalización de estas rutas al resto del disco durante la regeneración y ser responsables de los efectos de muerte celular no autónomos que observamos 20 hs DC en áreas alejadas del borde de la herida.

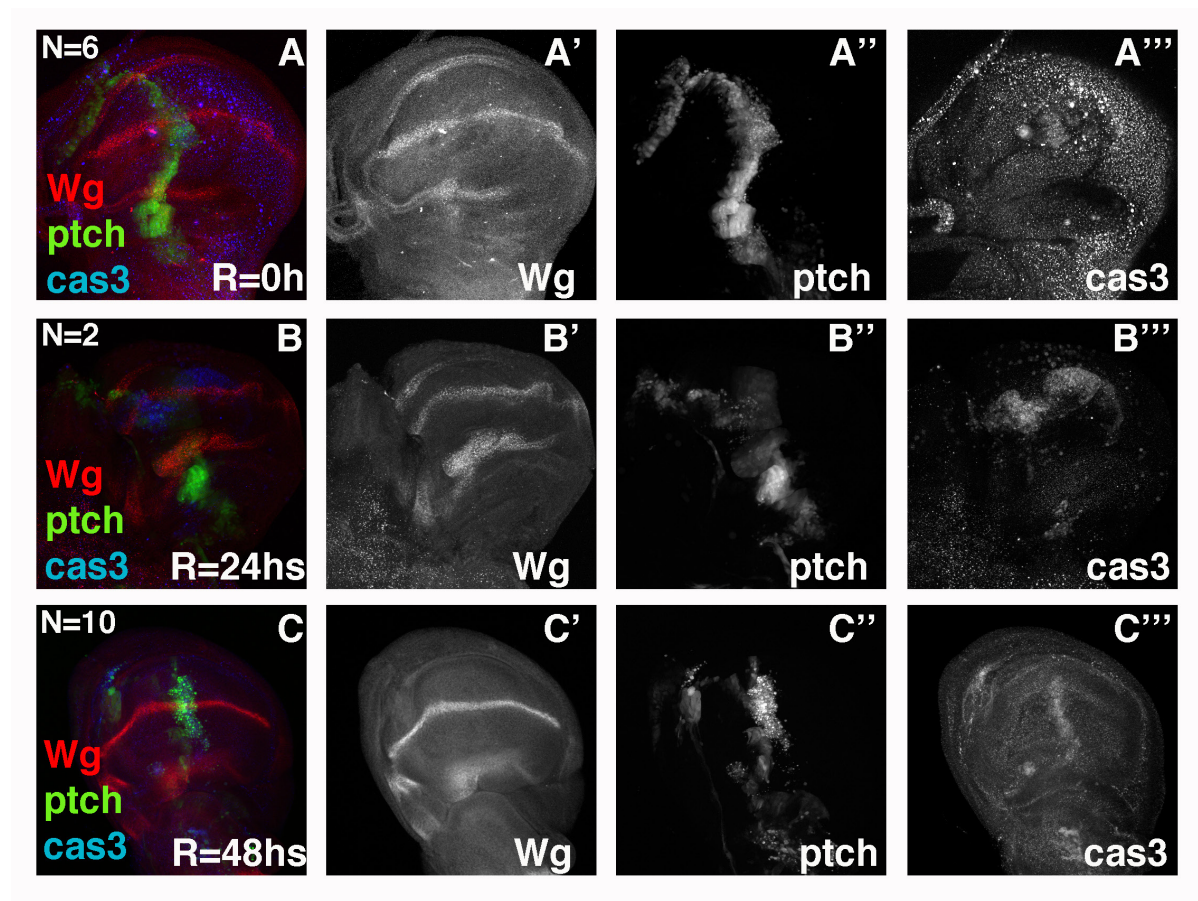


Figura R 34. Efectos de la sobre-expresión del ligando *eiger* de la vía de las JNK en el territorio *ptc-Gal4* (marcado en verde por *UAS-GFP* en A-C y gris en A'-C'') durante 24 hs. Los discos están teñidos con anti-Wg (en rojo A-C y en gris en A'-C') y anti-Caspasa3 activada (en azul en A-C y en gris en A'''-C'''). (A-A''') Discos disecados inmediatamente tras la inducción R=0, (B-B''') 24 hs más tarde, R=24 y (C-C''') tras 48 hs, R=48 a temperatura permisiva (25°C). No observamos cambios en la expresión de Wg en ninguno de los casos, pero si observamos efectos de muerte no-autónoma tras 24 hs (R=24) de recuperación (B-B''').

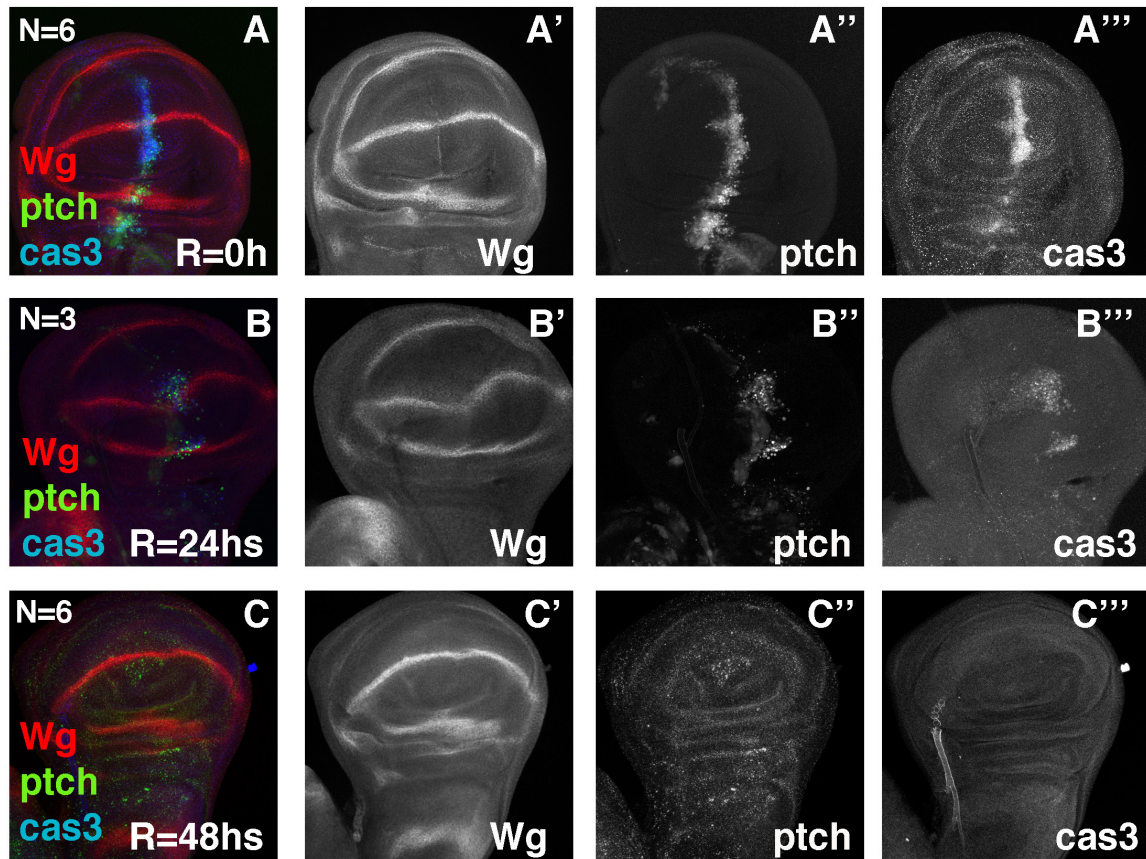


Figura R 35. Sobre-expresión de la quinasa *hep^{CA}* bajo la regulación de *ptc-Gal4* (el territorio *ptc* está marcado en verde por la expresión de GFP en A-C y en gris en A''-C''). Se muestra la expresión de Wg (en rojo A-C y en gris en A'-C') y la inducción de muerte celular con anti-Caspasa3 activada (en azul A-C y en gris en A'''-C''') a R=0 justo después de la inducción (A-A'''), tras 24 hs, R=24 (B-B'''), y tras 48 hs, R=48 (C-C'''). No observamos que la sobre-expresión de este factor tenga ningún efecto en la expresión de Wg. El incremento de muerte celular que observamos se restringe al dominio de expresión de *ptc*.

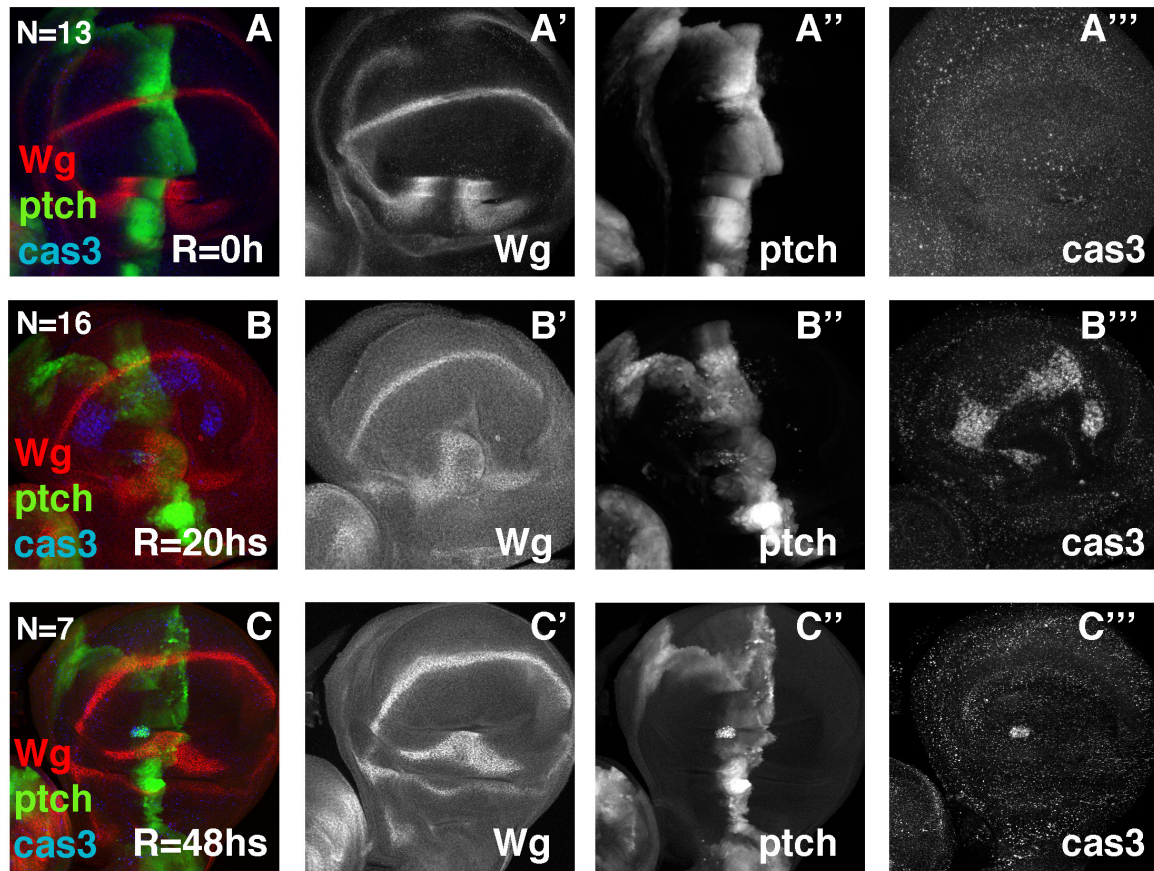


Figura R 36. Efectos de la sobre-expresión de *unpaired* (*upd*) en el dominio de expresión de *ptc-Gal4* (marcado en verde con *UAS-GFP* en A-C y gris en A'-C"). Se muestra la expresión de Wg por tinción con el anticuerpo anti-Wg (en rojo A-C y en gris en A'-C') y la activación de Caspasa3 por la tinción de anti-Caspasa3 activada (en azul A-C y en gris en A'''-C'''). Discos disecados inmediatamente tras la inducción R=0 (A-A'''), transcurridas 24 hs, R=24 (B-B''') y tras 48 hs, R=48 (C-C'''). La expresión de Wg no se vió afectada en ninguno de los casos estudiados. Encontramos un incremento de la apoptosis de forma no-autónoma tras 24 hs (R=24) de recuperación (B-B''').

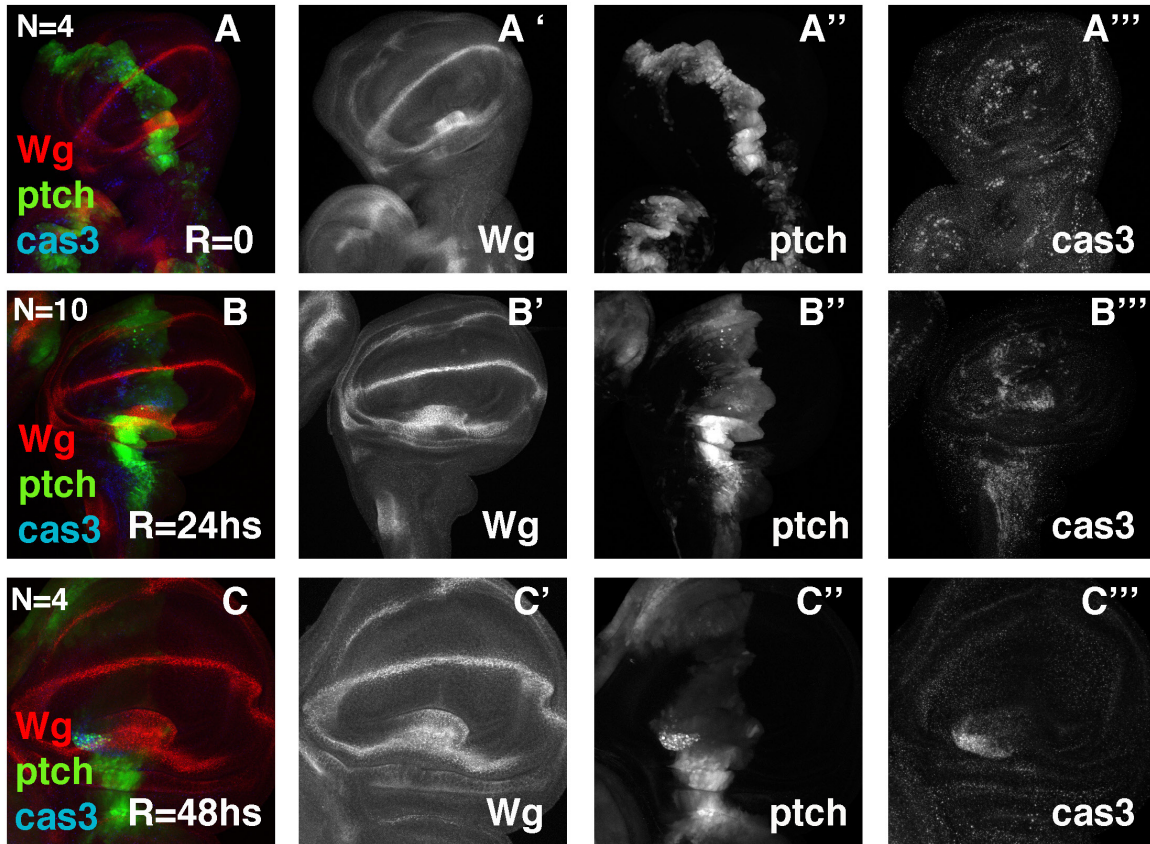


Figura R 37. Sobre-expresión de la quinasa *hop^{tum}* en dominio de expresión de *ptc-Gal4* (marcado en verde por *UAS-GFP* en A-C y en gris en A''-C'''). La expresión de Wg revelada con anti-Wg se muestra en rojo en A-C y en gris en A'-C', y las células apoptóticas se visualizaron con anti-Caspasa3 activada (en azul A-C y en gris en A'''-C'''). Los discos fueron disecados inmediatamente tras la inducción R=0 (A-A'''), a las 24 hs, R=24 (B-B''') y a las 48 hs, R=48 (C-C'''). La expresión de Wg no se vió afectada en ningún caso analizado, aunque sí observamos un incremento de la muerte celular de forma no autónoma a R=0 y R=24 (A-B''').

15. Importancia de la muerte celular durante el proceso de regeneración

El aumento de muerte celular asociado al proceso regenerativo, con patrón temporal y espacialmente reproducible, sugiere que la apoptosis puede jugar un papel importante para completar la regeneración. Para estudiar esta posible función bloqueamos la muerte celular sobre-expresando *UAS-p35* (un inhibidor de apoptosis de baculovirus) y *UAS-dIAP* (un inhibidor de las proteínas pro-apoptóticas en *Drosophila*) en todo el territorio presuntivo de ala (dirigido por la expresión de la línea *nubbin-Gal4*) en discos en regeneración.

Estudios previos han demostrado que la sobre-expresión de *UAS-p35* reduce el marcaje de TUNEL (que marca la presencia de muerte celular) en el territorio donde es expresa-

do (Bosch 2008) y que genera células “no muertas” que quedan integradas en el tejido sin ser delaminadas (Perez Garijo 2004). Estas células “no muertas” no producen señales, ni son capaces de responder a estímulos externos. En el análisis de la sobre-expresión de p35 se cruzaron moscas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* con moscas de genotipo *nubbin-Gal4; UAS-p35*, de la descendencia *nubbin-Gal4/ en-Gal4 UAS-GFP; UAS-p35/+* se extrajeron discos a los que eliminamos un fragmento del compartimento posterior, observamos que 20 hs DC, en contraste con lo observado en discos de larvas de genotipo salvaje, la expresión de marcadores de patrón tales como Wg no disminuía (Figura R 39). Además, estos discos nunca daban lugar a un ala adulta regenerada.

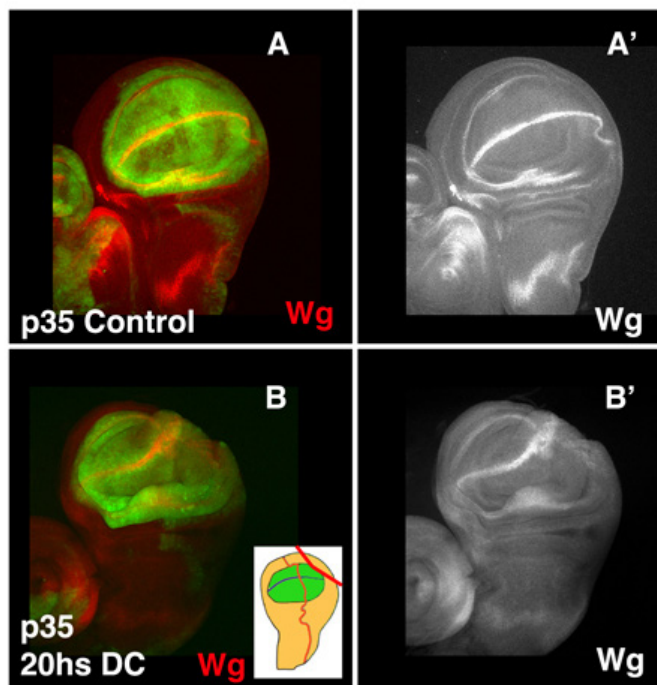


Figura R 38. Expresión de Wg en discos controles y regenerados *nubbin-Gal4/ en-Gal4 UAS-GFP; UAS-p35/+*. A diferencia de lo que ocurre durante el proceso de regeneración en discos de genotipo salvaje, en estos casos la expresión de Wg no disminuye cerca del borde de la herida. (A-A') Disco de genotipo control. (B-B') Disco regenerado 20 hs DC. (A-B) La expresión de *nubbin* se marca en verde y la de Wg en rojo en A-B y en gris en A'-B'.

Cuando sobre-expresamos el inhibidor de muerte celular *dIAP* seguimos observando células apoptóticas, marcadas con anti-Caspasa3, lo que indica que la expresión de este factor no es suficiente para bloquear la muerte celular asociada al proceso de regeneración. En estos discos, encontramos que la expresión de los distintos marcadores de patrón analizados son similares a los observados en discos controles en regeneración (Figura R 39). Sin embargo, en ninguna de las dos condiciones mutantes en las que se inhibió la muerte celular (con el inhibidor p35 o con la sobre-expresión de dIAP) se obtuvieron alas adultas completamente regeneradas.

Con los resultados obtenidos no podemos concluir qué papel exacto juega la muerte celular durante el proceso de regeneración. El hecho de que la sobre-expresión de los inhi-

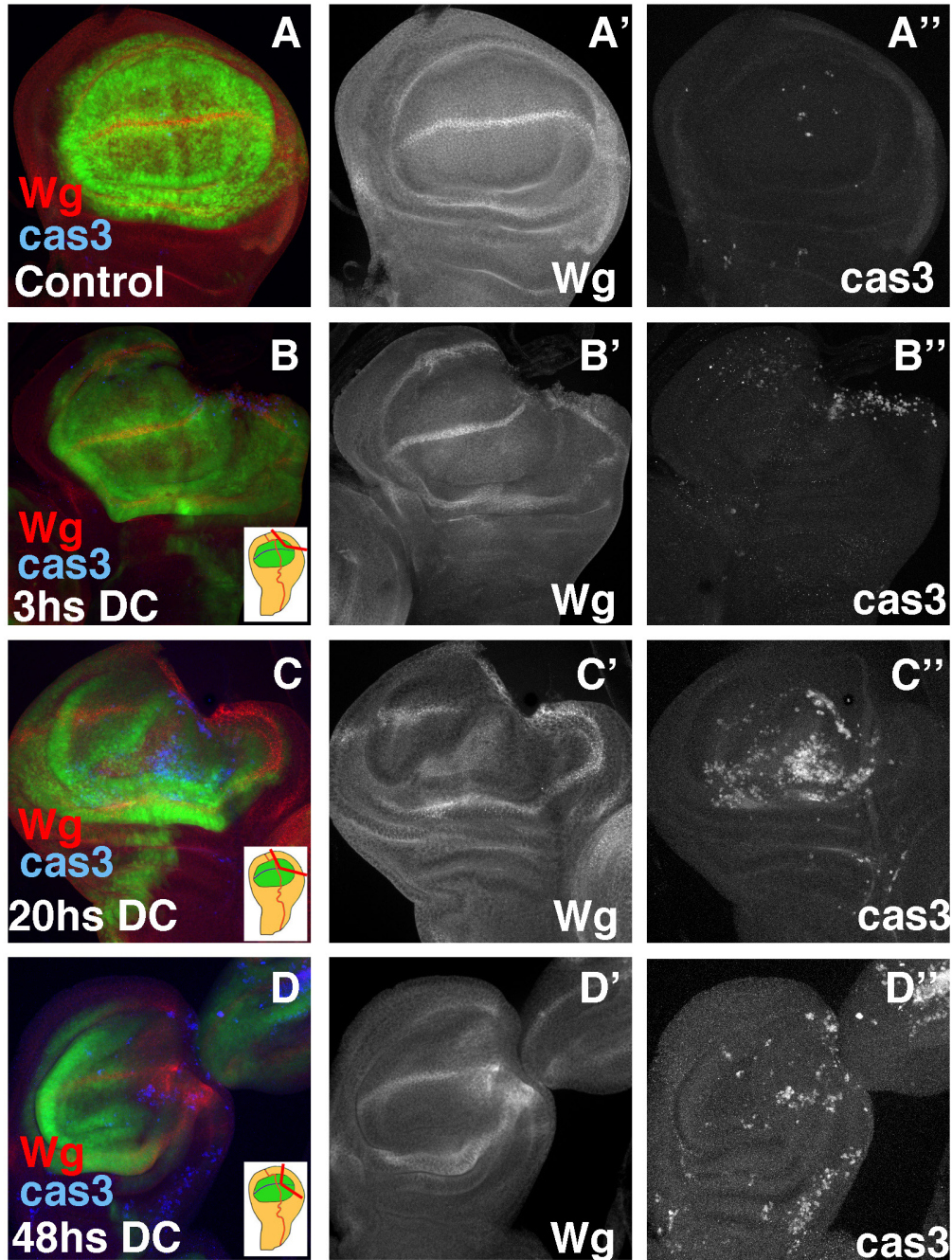


Figura R 39. Expresión de Wg (en rojo en A-D y en gris en A'-D') y Cas3 (en azul en A-D y en gris en A''-D'') en discos cortados de genotipo *nubbin-Gal4 UAS-GFP; UAS-dIAP*. La expresión del dominio *nubbin* se muestra en verde. (A-A'') Disco control sin cortar. (B-B'') Disco cortado en regeneración a las 3hs DC, donde observamos un pequeño cúmulo de células muriendo cerca del borde de la herida. La expresión de Wg está inalterada. (C-C'') Disco cortado en regeneración a las 20 hs DC. La apoptosis, al igual que en los discos de genotipo salvaje, se desplaza desde el borde de la herida hasta el compartimento anterior. En estos discos observamos una reducción de expresión de Wg en el borde D/V cerca del borde de la herida. (D-D'') Disco cortado en regeneración a las 48 hs DC. La expresión de Wg se ha restablecido y solo quedan pequeños grupos de células apoptóticas en el borde de la herida y áreas cercanas a esta. (A-D) La expresión de *nubbin* se muestra en verde, la de Wg en rojo y la de Cas3 activada en azul. (A'-D') Expresión de Wg en gris. (A''-D'') Expresión de Cas3 activada en gris.

bidores de la muerte celular p35 o dIAP no permitan completar el proceso de regeneración, nos hace pensar que bien o la apoptosis o la eliminación de las células muertas del epitelio, es un paso necesario para que progrese la regeneración.

16. Desarrollo de un método de estudio de reorganización de patrón *in Vitro*

Uno de los principales problemas asociados al cultivo de los discos *in vitro*, es que al no producirse en condiciones fisiológicas se produce una parada de la división celular. Nuestros datos indican que algunos de los procesos asociados a la regeneración pueden proceder incluso en ausencia de la proliferación. Así, decidimos poner a punto un sistema de cultivos *in vitro* para poder analizar las primeras fases de la regeneración y documentarlos en forma de películas.

El objetivo es cultivar discos imaginales a los que se les eliminó un fragmento del compartimento P y, usando técnicas de microscopía óptica confocal que permiten el cultivo de material vivo, realizar un análisis detallado del proceso de regeneración, usando como marcadores proteínas de fusión con GFP o RFP (Red Fluorescent Protein), o distintas líneas que dirijan la expresión de GFP a distintos territorios de ala.

Dado que se ha observado que la cicatrización y el cierre de la herida se ve ralentizado en los cultivos *in vitro*, en nuestros ensayos preliminares, procedemos a la eliminación del fragmento dentro de una larva *bs-GFP (in situ)* y esperamos 1-2 hs antes de disecarla, con el fin de que el proceso de cicatrización ocurriera en condiciones fisiológicas. Tras este tiempo, el disco fue extraído de la larva y sumergido en medio de cultivo. De estos discos se tomaron imágenes de confocal de 15 secciones en el eje Z (que cubrían todo el grosor del disco) cada 20 minutos, durante alrededor de 12 hs (Video 2). Nuestros resultados sugieren que las células del borde de la herida tienden a entrar en apoptosis, dejando paso a células que se movilizan desde áreas cercanas a la herida e incluso células provenientes del compartimento A, para regenerar la parte del disco seccionada. Además, observamos que la expresión de Bs se disminuyó cerca del borde de la herida 12 hs DC.

Los resultados obtenidos nos parecen especialmente interesantes, dado que este método nos permite observar movimientos celulares y reorganización del tejido cerca del borde de la herida, y nos abre un abanico de numerosas posibilidades. Entre nuestras perspectivas de futuro se encuentran realizar un análisis clonal *in vitro*, con el fin de estudiar qué células están colaborando en la reconstrucción de la herida. Este método nos permitiría también estudiar posibles cambios epigenéticos que ocurrieran durante la regeneración, mediante el uso de reporteros de actividad de las proteínas del grupo Polycomb y Trithorax, que

podrían haberse visto enmascarados en los ensayos de qPCR. También se podría realizar un análisis *in vitro* de la evolución del proceso de regeneración en distintos fondos mutantes para distintas rutas de señalización, lo cual serviría para estudiar los requerimientos de estas rutas durante la regeneración.

La combinación del método de estudio *in situ* e *in vitro* permite que se produzcan los procesos iniciales de cicatrización sin los cuales no puede comenzar la correcta recuperación del disco. Además, el avance en el desarrollo de nuevas herramientas genéticas, como son los nuevos sistemas de marcaje de linaje (Herrera, Martin et al. 2013) y los sistemas binarios *Gal4/UAS Gal80^{ts}* y *QF/QUAS*, que permiten la manipulación simultánea e independiente de grupos de células, hacen de este método un sistema idóneo para revelar procesos, movimientos y características celulares, así como respuestas morfogénicas que se dan durante la regeneración.

Discusión

Con el fin de estudiar el proceso de regeneración en *Drosophila* se han desarrollado numerosos sistemas, como cultivos *in vitro* o *in vivo* de discos fragmentados, o el método de inducción de muerte celular localizada mediante el sistema binario *Gal4/UAS* en combinación con *Gal80^{ts}* (Smith-Bolton et al., 2009). Estas técnicas presentan diferentes limitaciones (véase la introducción) que dificultan el análisis de los diferentes procesos que se producen durante la regeneración. Nuestro enfoque también exhibe dificultades técnicas, específicamente en la reproducibilidad de cortes precisos. Sin embargo, tiene varias ventajas sobre los métodos anteriormente descritos. En primer lugar, la regeneración del disco siempre se produce en un contexto fisiológico de desarrollo. En segundo lugar, al realizar una amputación quirúrgica no es necesario inducir de forma artificial la activación ectópica de ninguna señal que podría perturbar el proceso normal de regeneración. Además, debido a que sólo eliminamos un fragmento de uno de los discos, el disco contra-lateral se puede utilizar como control interno. Por otro lado, el patrón y el tamaño del ala de los adultos derivadas de discos regenerados pueden ser comparados con las alas control.

Aprovechando estas ventajas, hemos podido identificar varios aspectos del proceso de regeneración de los discos de ala que habían pasado desapercibidos hasta el momento.

1. Análisis de estructuras adultas después del proceso de regeneración

La técnica desarrollada en esta tesis permite analizar las características morfológicas de los órganos adultos tras el proceso de regeneración. De esta manera, es posible obtener alas adultas perfectamente diferenciadas que pueden ser comparadas con el ala contra-lateral control para identificar si existen diferencias de patrón y/o tamaño como consecuencia del proceso regenerativo.

Nuestros resultados indican que existen diferencias significativas entre el fenotipo de las alas adultas regeneradas y las controles, dependiendo del momento en el que se amputa el fragmento (edad de la larva) y del tamaño de la región eliminada. Al realizar un corte en una larva de estadio tres tardío (24 hs AFP), el ala siempre presenta pérdida de tejido que se manifiesta en grandes muescas. Esto ocurre incluso cuando el fragmento eliminado es relativamente pequeño, lo cual indica que no ha ocurrido regeneración o que ésta ha sido mínima. Estos datos sugieren, como previamente había sido propuesto (Smith-Bolton, Worley et al. 2009), que durante el final del tercer estadio larvario hay una pérdida de la capacidad regenerativa. Desconocemos las causas de tal efecto. Una posibilidad sería que la entrada en pupación paralizase el proceso de regeneración al estar induciendo el comienzo de la diferenciación. De esta manera no existiría tiempo para completar la regeneración. Si esto fuera así, esperaríamos que en condiciones mutantes en las que se alargase el periodo larvario, la

regeneración pudiera completarse incluso en discos que fueran cortados a edades larvarias muy avanzadas. Alternativamente, otra posibilidad sería que al final del tercer estadio larvario, los mecanismos que incrementan la plasticidad celular y que permiten la regeneración ya no fueran operativos.

En estadios más tempranos en general observamos una buena correlación entre la cantidad de tejido amputado y el fenotipo del ala adulta tras el proceso de regeneración. Así, cuando el fragmento amputado es menor del 40% del compartimento posterior, encontramos un alto porcentaje de discos que completan la regeneración y dan lugar a alas normales. Sin embargo, cuando eliminamos una sección grande del compartimento posterior (>50%) o afectamos en un corte grande al borde A/P de los discos, las alas derivadas de estos son vestigiales. Esto sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, los discos en los que se elimina gran parte del compartimento P y además la amputación afecta al borde A/P, nunca regeneran completamente. No obstante, otros estudios muestran que los discos de ala en los que la ablación genética afecta a prácticamente la totalidad del territorio putativo de ala, eliminando este borde, aún pueden regenerar (Smith-Bolton, Worley et al. 2009). Esta diferencia se debe probablemente al momento en el que se produce la ablación. Lo más temprano que nuestra técnica nos permite realizar un corte en los discos es entre 96-120 h AEL. Por el contrario, el método de ablación genética, en el que se induce muerte celular en un territorio del disco de ala determinado, permite dañar los discos mucho más temprano. Así, si el tiempo necesario para restaurar el daño causado es mayor cuanto más grande es la región eliminada, en nuestras condiciones experimentales sólo podríamos ver una regeneración completa en discos con daños moderados. Una situación extrema sería cuando eliminásemos más del 50% del compartimento P y afectáramos al borde A/P, en este caso, el tiempo para la reconstrucción de este borde sería mucho mayor y la entrada en pupación paralizaría toda la reconstrucción dando lugar a la diferenciación de alas vestigiales. Por otro lado, el hecho de que observemos un incremento de la muerte celular por todo el disco en amputaciones de grandes secciones que además afectan a ambos compartimentos, podría estar produciendo un colapso del tejido, por lo que el tiempo de recuperación requerido sería aún mayor.

2. Patrón y tamaño del ala regenerada

Entre los distintos tipos de alas adultas que hemos descrito tras la regeneración, uno de los que más nos ha llamado la atención es el de las alas regeneradas más pequeñas que las control, con un patrón de venas relativamente normal. ¿Cómo se podrían formar este tipo de alas? Como hemos descrito anteriormente, estas alas se desarrollan a partir

de discos amputados en los que la especificación de la región proximal redefine un nuevo territorio presuntivo de ala mucho más pequeño de lo normal. Los datos obtenidos de nuestro análisis con distintos marcadores de patrón, indican que tras la amputación, el territorio de vena/intervena desaparece en gran parte del disco de ala, para restablecerse durante el proceso regenerativo, posiblemente en el momento en el que se produce la reestructuración del tejido. En este escenario, el patrón de venas podría ser reajustado al nuevo tamaño de la región presuntiva de ala de manera que finalmente no quedara alterado. Para alcanzar el tamaño correcto del ala y por tanto completar la regeneración, la proliferación celular sería necesaria. En consecuencia, si no hay suficiente tiempo para terminar este proceso antes de la formación del pupario, el ala final tendría un tamaño menor que el control, pero un patrón normal.

3. Papel de *wg* durante la regeneración de los discos.

Estudios previos han demostrado que durante la regeneración, en respuesta al daño tisular mediado por apoptosis, se produce un incremento de expresión de *wg*. Estos experimentos indican que *Wg* se mantiene a niveles altos durante las primeras 24 horas de recuperación, reduciendo sus niveles a medida que va ocurriendo el proceso de regeneración. Alrededor de 48 horas después de la ablación, los niveles de *Wg* decrecen hasta desaparecer parcialmente en estos discos. Finalmente, el patrón normal de expresión de *Wg* del tercer estadio de larva se recupera 72 horas después de la ablación (Smith-Bolton, Worley et al. 2009). Utilizando nuestro sistema, hemos encontrado que entre 18 y 24 hs DC los niveles de *Wg* disminuyen a lo largo del borde D/V. Además, los resultados revelan que la reducción de la expresión de *wg* mediante el uso de su *ARNi* no perturba la etapa inicial de la regeneración, ya que en esta situación se completa el proceso de cicatrización y se observa un pico de división celular en el blastema, como sucede en discos control. Creemos que las discrepancias entre nuestros resultados y los datos publicados anteriormente (Smith-Bolton, Worley et al. 2009) son consecuencia de los distintos métodos utilizados. Se ha demostrado previamente que los niveles de expresión de *wg* se incrementan cuando se induce apoptosis (Perez-Garijo, Martin et al. 2004; Ryoo, Gorenc et al. 2004). El hecho de que Smith-Bolton y col. también encontrara que la expresión de *wg* se reducía durante el periodo de recuperación, sugiere que la activación inicial de *wg* podría deberse al incremento de muerte celular producido por la expresión ectópica del inductor de apoptosis. Así, una vez que este efecto hubiera concluido, *Wg* disminuiría sus niveles durante el proceso de regeneración, de forma similar a nuestras observaciones.

Otra diferencia importante entre nuestro método y el de ablación genética es que

mientras nosotros eliminamos un fragmento completo del disco, la inducción de apoptosis causa daño difuso a los tejidos de forma que permite que las células sanas co-existan con células muertas. De esta manera, las células muertas podrían enviar algún tipo de señales a las células que las rodean. En efecto, las respuestas celulares podrían estar funcionando de manera distinta dependiendo de si el tejido sólo es dañado o es eliminado por completo. De hecho, hemos encontrado que en la mayoría de los casos, cuando los discos de ala fueron sólo dañados con unas pinzas sin eliminar completamente el fragmento, Wg mostraba altos niveles (Figura D1).

Por otro lado, usando el método clásico de trasplante de discos se ha encontrado un incremento en la expresión de *wg* durante la regeneración del disco de pata. Estos experimentos se realizaron utilizando el disco protorácico de pata 1 (P1) que tiene un potencial regulador único, lo cual permite que las células del compartimento anterior puedan dar lugar a tejido con identidad posterior directamente durante la regeneración. El resto de discos no tienen esta capacidad. Por lo tanto se ha propuesto que después de la fragmentación de la P1, las células que expresan Hedgehog (Hh) en la membrana peripodial, se fusionan con las células columnares en el sitio de la herida e inducen la expresión de *engrailed*, que

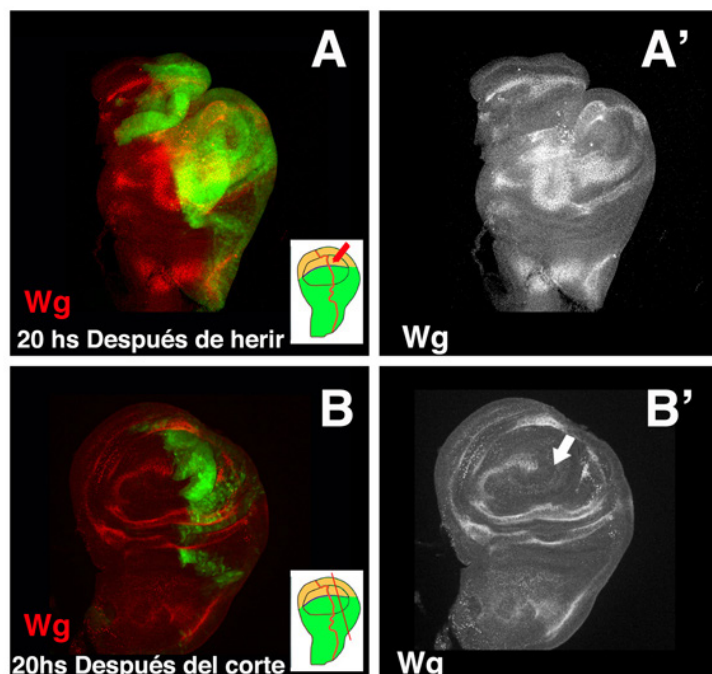


Figura D 1. Comparación entre infligir una herida en el disco de ala (A-A') y eliminar un fragmento (B-B'). Los niveles de Wg se incrementan 20 hs después de infligir una herida (A-A'). De manera contraria, al eliminar un fragmento del disco los niveles de Wg disminuyen (Wg aparece en rojo en A-B y gris en A'-B').

promueve la expresión de *wg* en las células adyacentes. Por lo tanto, la activación ectópica de *wg* en el borde de la herida de la P1 durante el proceso de regeneración es probablemente consecuencia de la peculiaridad de este disco.

Nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de *wg* no perturba las primeras etapas de la regeneración. Sin embargo, no podemos descartar una función importante de este gen en etapas posteriores de la regeneración. Debido a que *wg* es necesario para el correcto desarrollo del disco de ala, al eliminarse su función durante la regeneración, las alas adultas resultantes, tanto control como regenerada, muestran muescas muy similares. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las muescas que presentan estas alas regeneradas no son debidas a un requerimiento de *wg* durante el proceso regenerativo, sino a la insuficiencia de *wg* durante el desarrollo.

4. Función de señalización de Notch durante la regeneración

Durante el desarrollo del disco de ala, la ruta de Notch regula la proliferación celular en función del contexto de desarrollo. Así, la expresión ectópica de la vía de Notch induce sobre-crecimientos en la región del disco que dará lugar a la axila (Go, Eastman et al. 1998) (Giraldez and Cohen 2003) (Baonza and Garcia-Bellido 2000) (San Juan, Andrade-Zapata et al. 2012), mientras que esta ruta bloquea la proliferación celular de forma autónoma en el borde D/V y la región presuntiva del ala. Esta función se ejerce a través de la represión de la expresión del proto-oncogen *dMyc* y el micro-ARN *bantam*, los cuales son requeridos para promover la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S (Herranz and Milan 2008). De acuerdo con esta función represiva de Notch regulando la proliferación celular, esperaríamos que durante la regeneración, la actividad de Notch disminuyera, permitiendo el incremento de proliferación celular que hemos observado durante este proceso. Nuestros resultados confirman esta predicción, ya que encontramos que durante la regeneración, la función de esta vía de señalización se reduce en la región presuntiva de ala. Esta disminución en la regulación de la actividad de Notch durante la regeneración podría explicar la reducción de *Wg* en borde D/V, y la expresión ectópica de *dMyc* en el borde de la herida (Smith-Bolton, Worley et al. 2009). En otras regiones del disco de ala donde la expresión del *wg* no está regulada por señalización de Notch, como el territorio que dará lugar a la axila y al tórax, *Wg* no está alterado.

5. Alteración en los bordes de compartimento.

Los discos imaginales son estructuras en proceso de crecimiento no diferenciadas, pero las células que los componen tienen un alto grado de determinación genética. Así, los bordes A/P y D/V delimitan los compartimentos. Cada compartimento contiene una población de células con un programa de desarrollo común. El mantenimiento de estos programas está bajo la regulación de los llamados genes selectores, cuyo estado de actividad especifica las cualidades de cada compartimento (García-Bellido, Ripoll et al. 1973; Crick and Lawrence 1975; Garcia-Bellido, Ripoll et al. 1976) (Lawrence and Morata 1976). Los estudios clásicos mostraron mediante análisis clonales en discos cortados, que durante el proceso de regeneración los bordes de compartimento se pierden temporalmente, para posteriormente ser redefinidos. En situaciones extremas también se observó que el borde A/P puede volverse laxo permitiendo que ciertas células cambien su identidad (Szabad, Simpson et al. 1979).

Estudios posteriores de regeneración *in vivo* (Bosch et al., 2008) y de ablación genética (Smith-Bolton, Worley et al. 2009) (Bergantinos, Corominas et al. 2010) (Worley, Setiawan et al.) propusieron que los compartimentos son unidades independientes de regeneración. De esta manera, después de una ablación genética no se pierde la identidad de los compartimentos (Smith-Bolton, Worley et al. 2009), la inducción de muerte en un compartimento no promueve un incremento de proliferación en el otro (Bergantinos, Corominas et al. 2010), y cortes en discos cultivados *in vivo* no provocan que las células de un compartimento contribuyan a la reconstruir del otro (Bosch, Baguna et al. 2008).

Sin embargo, Herrera S.C. ha demostrado recientemente que las identidades de ambos compartimentos pueden ser reprogramadas tras la ablación genética de un compartimento entero, y que esta reprogramación está modulada por la actividad de los grupos de proteínas Polycomb y Trithorax (Herrera, Martin et al. 2013).

Utilizando nuestro sistema no hemos observado cambios en la identidad de ninguno de los compartimentos. El borde A/P se mantiene durante el proceso de regeneración. El único efecto que observamos en algunas ocasiones es que la expresión de *engrailed* en el borde está menos definida que en discos control. En nuestras condiciones experimentales, el borde D/V no se encuentra alterado o es restaurado inmediatamente. El hecho de que durante la regeneración observemos una disminución en los niveles de Wg en el territorio presuntivo de ala 20 hs DC, podría indicar que este borde puede estar comprometido o alterado temporalmente. La expresión de *ap* no parece que tenga cambios significativos durante la regeneración.

6. Muerte celular durante la regeneración

El estudio de la función de la apoptosis durante la regeneración hasta el momento no había sido abordado en detalle debido a los problemas que presentan las distintas técnicas utilizadas para estudiar este proceso durante la regeneración de los discos (véase introducción). En cambio, nuestro método nos permite analizar la contribución de la muerte celular al proceso regenerativo de los discos. Sorprendentemente hemos observado que durante la regeneración, la muerte celular presenta un patrón conservado tanto temporal como espacialmente. Nuestros datos indican que tras la amputación, las células apoptóticas aparecen concentradas cerca de la herida, pero que a medida que la regeneración avanza la muerte se extiende por distintas regiones del disco, preferentemente a lo largo del borde D/V. De manera que transcurridas 20 hs DC encontramos grupos de células apoptóticas muy alejadas del sitio de corte, incluso en el compartimento anterior no alterado inicialmente.

El incremento de la muerte en el borde de la herida probablemente se debe a que tras la amputación, muchas células quedan dañadas o pierden los contactos con sus células vecinas terminando por morir. Es más sorprendente el aumento de la apoptosis en células alejadas, ya que indica que de forma activa se deben enviar señales desde el lugar del corte que promueven la inducción de muerte celular de forma no autónoma en distintas regiones del disco de ala. Alternativamente, es posible que este incremento de apoptosis se deba a tensiones mecánicas que se generen en el sitio de corte y que se transmiten a lo largo de todo el disco induciendo muerte celular. ¿Que señales podrían estar induciendo apoptosis de forma no autónoma? Los candidatos idóneos para producir este efecto son las rutas de señalización de JNK o JAK/STAT. Como hemos indicado anteriormente, estas rutas se activan inicialmente en el borde de la herida y se extienden posteriormente por el resto del disco. Además, la ruta JNK juega un papel clave en la inducción de muerte celular. El hecho de que la activación ectópica de ambas rutas de forma individualizada y temporal utilizando el sistema Gal4/Gal80^{ts} sea capaz de inducir apoptosis más allá del domino donde son sobre-expresadas, sugiere que ambas rutas podrían ser las responsables de la inducción de muerte celular “no autónoma” observada durante la regeneración.

Recientemente, ha sido identificado un nuevo mecanismo por el cual, las células apoptóticas son capaces de inducir muerte celular en regiones alejadas de donde son activadas, inclusive de diferente compartimento (Perez-Garijo, Fuchs et al.). Esto indica que las células que están muriendo, pueden liberar factores pro-apoptóticos que inducen muerte celular en áreas alejadas de éstas. En este trabajo se identificó Eiger, como la señal responsable de la apoptosis inducida por apoptosis (AIA). Eiger se produce en las células apoptóticas, a través de la activación de la vía de las JNK, y es capaz de propagar el estímulo apoptótico inicial por el resto del disco (Perez-Garijo, Fuchs et al. 2013). Estos resultados

apoyarían un modelo en el que la ruta JNK fuera responsable de la inducción de muerte celular por distintas regiones del disco durante la regeneración.

A pesar de la reproducibilidad del patrón de muerte celular observado durante la regeneración, no hemos sido capaces de establecer cuál es su función. La sobre-expresión de factores inhibidores de apoptosis como dIAP no ha sido suficiente para bloquear la muerte en discos en regeneración, como indica el gran número de células que expresan Caspasa 3 activada observado en esta situación. Esto sugiere que deben estar funcionando distintos mecanismos inductores de muerte durante la regeneración.

La sobre-expresión de p35 afecta el proceso normal de regeneración, ya que cuando sobre-expresamos este factor encontramos un alto porcentaje de discos que no completan la regeneración con normalidad dando lugar a alas adultas con grandes muescas. Además, a diferencia de lo que ocurre en discos controles, los niveles de Wg no se reducen durante las primeras horas de la regeneración. Distintos trabajos han demostrado que la sobre-expresión de este factor genera células “no muertas” (Huh, Guo et al. 2004) (Perez-Garijo, Martin et al. 2004) (Ryoo, Gorenc et al. 2004) (Martin, Perez-Garijo et al. 2009). Estas células inician el proceso apoptótico pero no terminan de eliminarse del epitelio. Así, los efectos producidos durante la regeneración por la sobre-expresión de p35 podrían deberse a distintas causas, como por ejemplo, que las células “no muertas”, al no delaminarse, interrumpen la señalización celular y obstaculicen los procesos morfogénicos necesarios para que la regeneración proceda con normalidad.

7. Integración de las distintas vías de señalización durante la regeneración del disco de ala

Durante la regeneración se produce una pérdida temporal de marcadores de destino celular que puede afectar a regiones muy alejadas de la herida. Esto sugiere que en el sitio del corte se deben estar activando diferentes señales capaces de inducir este efecto a lo largo del disco.

Nuestros resultados muestran que la activación individual de las vías de señalización analizadas no explica todos los efectos que suceden durante el proceso regenerativo. Así pues, debe estar funcionando de manera integrada una combinación de diferentes vías de señalización. Para estudiar esta posibilidad, sería interesante analizar si la activación simultánea de diferentes vías de señalización es capaz de reproducir los efectos autónomos y no-autónomos de muerte celular y formación de patrón que observamos durante la regeneración.

8. Fases de regeneración del disco imaginal de ala.

Nuestros resultados sugieren que el proceso de regeneración del disco se puede dividir en diferentes fases: cicatrización de la herida, pérdida de identidad celular, especificación de las regiones proximales de los discos del ala y re-desarrollo. Así, tras la amputación de un fragmento del disco, la integridad epitelial sería restablecida a través del proceso de cicatrización. Durante este proceso o instantes después, se activan en la herida diferentes señales que inducen la formación del blastema y producen la pérdida temporal de marcadores de destino celular, tanto en el borde de la herida como en regiones adyacentes. Esto incluye las células del margen del ala, como indica la falta de expresión de *wg* en el borde D/V. La expresión de este gen disminuye a lo largo del borde D/V incluso en regiones alejadas del borde de la herida, y esto podría explicar la presencia de muescas en el compartimiento anterior en algunas de las alas derivadas de discos en los que sólo amputamos parte del compartimiento P. Una vez que estos procesos han concluido, o al mismo tiempo, se produce la reespecificación de las regiones proximales, como indica el restablecimiento de la expresión de los marcadores proximales *zfh2*, *Hth* y la expresión del anillo interno de *Wg*. A pesar de que la proliferación celular aumenta durante las primeras etapas de la regeneración, nuestros datos indican que estos procesos pueden tener lugar en ausencia de división celular. Por último, ocurriría la fase de re-desarrollo, que imita el desarrollo normal. Hemos observado que la expresión de *ap* no se modifica durante la regeneración. Así, una vez se han especificado las regiones proximales, la definición del margen del ala y el establecimiento de las regiones distales podrían restablecerse como ocurre durante el desarrollo normal, por la interacción entre las células que expresan *ap* y las que no lo expresan, ya que hemos observado que la expresión de este gen selector no se modifica durante la regeneración. Una vez establecido el margen del ala, este puede funcionar como centro organizador del crecimiento y la definición del patrón a través de los mecanismos normales que operan durante el desarrollo.

9. Epimorfosis vs morfálaxis

Diferentes estudios han sugerido que los discos de ala regeneran mediante un proceso de proliferación intercalar, siguiendo un modelo epimórfico (Haynie and Bryant 1976; Bergantinos, Vilana et al. 2010). Sin embargo, en este trabajo presentamos resultados que sugieren que durante la regeneración de los discos ocurren distintos procesos independientes de la proliferación, o con poca contribución de la misma. Uno de los indicios a favor de ello, fue el hecho de encontrar que, algunas de las alas diferenciadas tras el proceso de regeneración tenían un patrón relativamente normal, pero eran significativamente más

pequeñas que las alas control. Tras analizar en profundidad la evolución de los discos en los que bloqueamos la proliferación durante su regeneración, encontramos que seguía teniendo lugar la pérdida temporal de los marcadores de destino celular y la reorganización de tejidos observada durante la regeneración normal en discos controles. Estos datos sugieren que durante la regeneración de los discos existen mecanismos independientes de división celular que recuerdan a algunos de los procesos que ocurren durante la regeneración morfoláctica.

Durante la regeneración de las extremidades en anfibios, modelo paradigmático de la regeneración epimórfica, se ha observado una reordenación de la información posicional a través de eventos intercalares, como ocurre en organismos que siguen un modelo morfoláctico. Sobre la base de estas observaciones, (Agata, Saito et al. 2007) propuso que ‘epimorfosis’ y ‘morfalaxis’ no deberían ser utilizados para clasificar los fenómenos de regeneración, y que las categorías clásicas de regeneración deberían ser reconsideradas. Después de evaluar nuestros datos, proponemos que la clasificación de la regeneración del disco de ala de *Drosophila* como un modelo epimórfico también debe ser examinada, ya que hemos encontrado que en este sistema biológico existen procesos que tienen características de ambos modelos de regeneración en este sistema.

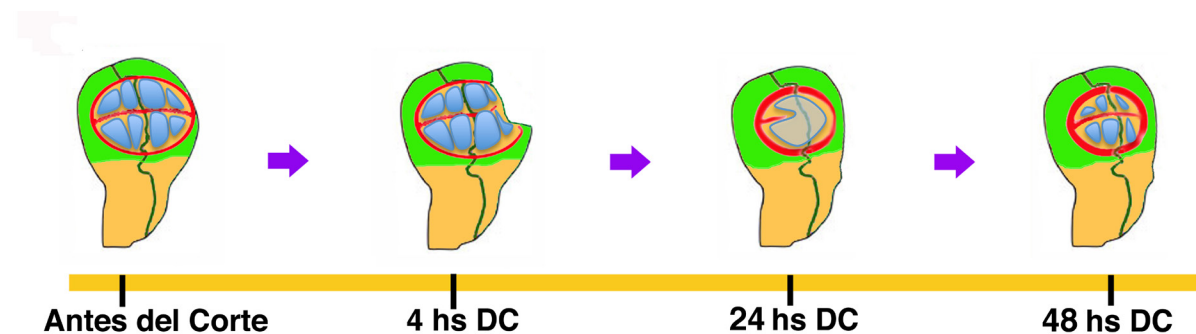


Figura D 2. Modelo propuesto en regeneración del disco de ala. En este modelo se puede observar que uno de los procesos que ocurren pocas horas DC es la cicatrización de la herida. Posteriormente se produce la formación del blastema en el borde de la herida y comienza a perderse los marcadores de destino celular. Así, 24 hs DC, comenzamos a ver como comienzan a redefinirse los valores proximales y el tejido sufre una reorganización de patrón. 48 hs DC, se restablece el borde D/V y la expresión de los marcadores de patrón.

Conclusiones

1) El proceso de regeneración no puede completarse cuando la amputación se realiza en discos de larvas de tercer estadio tardío, más tarde de 24 hs antes de la formación del pupario.

2) Los procesos de cicatrización e incremento de la proliferación celular que suceden durante la regeneración de los discos, ocurren mucho antes de lo propuesto cuando la regeneración se produce en condiciones fisiológicas.

3) Durante la regeneración de los discos imaginales se produce un incremento de la muerte celular, que inicialmente se localiza en las células del borde de la herida, pero que posteriormente se extiende por distintas regiones del disco, incluso afectando al compartimento adyacente al dañado.

4) Asociado al proceso de regeneración de los discos hay una pérdida temporal de distintos marcadores de destino celular.

5) Tras la amputación de un fragmento de los discos, y asociado al proceso regenerativo se produce una reorganización y re-especificación del tejido remanente. Esto puede dar lugar a alas adultas regeneradas más pequeñas que las controles pero con un patrón normal.

6) La definición de las distintas regiones del disco de ala que ocurren durante la regeneración sucede de una forma secuencial, de manera que primero se establecen los marcadores de las regiones proximales del disco.

7) Algunos de los procesos asociados a la regeneración como son la cicatrización, pérdida de marcadores de destino y reorganización del tejido remanente, no dependen de la división celular.

8) Las etapas iniciales de la regeneración pueden ocurrir con niveles indetectables de Wingless. Además, la expresión de este gen disminuye en el borde dorsal/ventral durante el proceso regenerativo como consecuencia de una disminución de la actividad de la ruta de Notch.

9) Ninguna de las rutas de señalización analizadas, JNK, JAK-STAT e HSW reproduce por si solas los efectos encontrados durante la regeneración.

1) Regeneration can't be completed when the amputation is performed in late third larval instar, later than 24 h before puparium formation.

2) Under physiological conditions the wound healing process and blastema formation, occurs much earlier than in transplantation experiments.

3) During regeneration, cell death initially increases in the wound edge, and posteriorly spreads throughout different regions of the wing disc, even affecting the adjacent compartment.

4) Associated with the regeneration process of the discs, there is a temporary loss of markers of cell fate commitment.

5) After amputation of a fragment of the disc, and due to the regenerative process, a reorganization and re-specification of remnant tissue is produced. This can give rise to regenerated adults wings, smaller than the controls wings, but with a normal pattern.

6) The re-definition of the different regions of the wing disc that occurs during regeneration proceed in a sequential manner, the markers of proximal regions of the disc are the first to be established.

7) Some of the process associated with regeneration, such as wound healing, the temporary loss of markers of cell fate commitment and reorganization of remnant tissue, can proceed even in the absence of cell division.

8) The initial stages of regeneration can occur with undetectable levels of *Wingless*. In addition, the expression of this gene decreases in dorsal/ventral border during the regenerative process as a result of the down-regulation of the activity of the Notch pathway.

9) None of the analyzed signaling pathways, JNK, JAK-STAT and HSW, reproduced for themselves the effects found during regeneration.

Bibliografía

Adachi-Yamada, T., K. Fujimura-Kamada, et al. (1999). "Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing." Nature **400**(6740): 166-9.

Affolter, M., T. Marty, et al. (2001). "Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*." Embo J **20**(13): 3298-305.

Agaisse, H., U. M. Petersen, et al. (2003). "Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury." Dev Cell **5**(3): 441-50.

Agata, K., Y. Saito, et al. (2007). "Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis." Dev Growth Differ **49**(2): 73-8.

Akimenko, M. A., M. Mari-Beffa, et al. (2003). "Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration." Dev Dyn **226**(2): 190-201.

Aldaz, S., L. M. Escudero, et al. (2010). "Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14217-22.

Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, et al. (1995). "Notch signaling." Science **268**(5208): 225-32.

Baonza, A. and A. Garcia-Bellido (2000). "Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2609-14.

Bate, C. M. and A. Martinez-Arias (1991). "The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*." Development **112**: 755-761.

Bergantinos, C., M. Corominas, et al. (2010). "Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling." Development **137**(7): 1169-79.

Bergantinos, C., X. Vilana, et al. (2010). "Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology." Bioessays **32**(3): 207-17.

Bergmann, A., A. Y. Yang, et al. (2003). "Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 717-24.

Blair, S. S. (1995). "Compartments and appendage development in *Drosophila*." Bio Essays **17**: 299-309.

Blair, S. S., D. L. Brower, et al. (1994). "The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*." Development **120**: 1805-1815.

Bodenstein (1943). "Hormones and tissue competence in the development of *Drosophila*." Biol Bull **84**: 34-58.

Bohn, H. (1976). "Regeneration of proximal tissues from a more distal amputation level in the insect leg (*Blaberus craniifer*, Blattaria)." Dev Biol **53**(2): 285-93.

Bosch, M., J. Baguna, et al. (2008). "Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs." Int J Dev Biol **52**(8): 1043-50.

Bosch, M., F. Serras, et al. (2005). "JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs." Dev Biol **280**(1): 73-86.

Botas, J. (2007). "Drosophila researchers focus on human disease." Nat Genet **39**(5): 589-91.

Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-89.

Brockes, J. P. and A. Kumar (2008). "Comparative aspects of animal regeneration." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 525-49.

Bryant, P. J. (1971). "Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*." Dev Biol **26**(4): 637-51.

Bryant, P. J. (1975). "Pattern formation in the wing imaginal disc of *Drosophila melanogaster*: Fate map, Regeneration and Duplication." J. Exp. Zool. **193**: 49-78.

Bryant, S. V., V. French, et al. (1981). "Distal regeneration and symmetry." Science **212**: 993-1002.

Burke, R. and K. Basler (1996). "Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing." Development **122**(7): 2261-9.

Calleja, M., E. Moreno, et al. (1996). "Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*." Science **274**(5285): 252-5.

Casares, F. and R. S. Mann (1998). "Control of antennal versus leg development in *Drosophila*." Nature **392**(6677): 723-6.

Castro, F. C., A. Magre, et al. (2012). "Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in Wistar rats." Homeopathy **101**(3): 147-53.

Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-80.

Cohen, B., A. Simcox, et al. (1993). "Allocation of the imaginal primordia in the *Drosophila* embryo." Development **117**: 597-608.

Cohen, S. M. (1993). Imaginal disc development. The development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate and A. Martínez Arias, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**.

Couso, J.-P., M. Bate, et al. (1993). "A *wingless* -dependent polar coordinate system in *Drosophila* Imaginal Discs." Science **259**: 484-489.

Crawford, E. D., J. E. Seaman, et al. (2012). "Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis." Cell Death Differ **19**(12): 2040-8.

Crick, F. H. C. and P. A. Lawrence (1975). "Compartments and polyclones in insect development." Science **189**: 340-347.

Crozatier, M., B. Glise, et al. (2002). "Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser." Development **129**(18): 4261-9.

Davis, R. J. (1999). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase." *Biochem Soc Symp* 64: 1-12.

de Celis, J. F. (2003). "Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins." Bioessays **25**(5): 443-51.

de Celis, J. F., A. García-Bellido, et al. (1996). "Activation and function of *Notch* at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc." Development **122**: 359-369.

Diaz-Benjumea, F. J. and S. M. Cohen (1993). "Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*." Cell **75**(4): 741-52.

Diaz-Benjumea, F. J. and S. M. Cohen (1995). "Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing." *Development* **121**(12): 4215-25.

French, V. (1981). "Pattern regulation and regeneration." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **295**(1078): 601-17.

French, V. P., P. J. Bryant, et al. (1976). "Pattern regulation in epimorphic fields." Science **193**: 969-981.

Fristrom, D., P. Gotwalds, et al. (1994). "*blistered*: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*." Development **120**: 2661-2671.

Fristrom, D. K. a. F., J. W. (1993). "The metamorphic development of the adult epidermis- in the The development of *Drosophila melanogaster*." Cold Spring Harbor Laboratory Press: 888-889.

Fristrom, J. W., D. Fristrom, et al. (1977). "The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*." Amer. Zool. **17**: 671-684.

Garcia-Bellido, A. and J. F. de Celis (1992). "Developmental genetics of the venation pattern

of *Drosophila*." Annu Rev Genet **26**: 277-304.

Garcia-Bellido, A. and J. R. Merriam (1971). "Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**: 2222-2226.

Garcia-Bellido, A., P. Ripoll, et al. (1976). "Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila melanogaster*." Dev. Biol. **48**: 132-147.

García-Bellido, A., P. Ripoll, et al. (1973). "Developmental compartmentalization of the wing disc of *Drosophila*." Nature New Biol. **245**: 251-253.

Gazel, A., M. Rosdy, et al. (2008). "Transcriptional profiling defines the effects of nickel in human epidermal keratinocytes." J Cell Physiol **217**(3): 686-92.

Gilbert, S. F. (2013). "Developmental Biology." Sinauer Tenth Edition.

Giraldez, A. J. and S. M. Cohen (2003). "Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development." Development **130**(26): 6533-43.

Go, J. M., D. S. Eastman, et al. (1998). "Cell proliferation control by *Notch* signaling in *Drosophila* development." Development **125**: 2031-2040.

Gómez-Skarmeta, J. L., R. Diez del Corral, et al. (1996). "*Araucan* and *caupolican*, two members of the novel *Iroquois* complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes." Cell **85**: 95-105.

Gomez-Skarmeta, J. L. and J. Modolell (1996). "araucan and caupolican provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing." Genes Dev. **10**: 2935-2945.

Gonzalez-Estevez, C. and E. Salo (2010). "Autophagy and apoptosis in planarians." Apoptosis **15**(3): 279-92.

Goto, S., Hayashi, S. (1997). "Cell migration within the embryonic limb primordium of *Dro-*

sophila as revealed by a novel fluorescence method to visualize mRNA and protein.”

Dev Genes Evol **207**(3): 194-198.

Grether, M. E., J. M. Abrams, et al. (1995). “The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death.” Genes Dev **9**(14): 1694-708.

Guillen, I., J. L. Mullor, et al. (1995). “The function of *engrailed* and the specification of *Drosophila* wing pattern.” Development **121**: 3447-3456.

Hadorn, E., G. Anders, et al. (1959). “Combination derived from partial dissociated imaginal disks of various mutants and types of *Drosophila*.” J Exp Zool **142**: 159-75.

Hadorn, E., R. Hurlimann, et al. (1968). “[Developmental capacity of embryonal blastema in *Drosophila* following cultivation in an adult host].” Rev Suisse Zool **75**(3): 557-69.

Harden, N. (2002). “Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*.” Differentiation **70**(4-5): 181-203.

Harvey, K. F. and I. K. Hariharan (2012). “The hippo pathway.” Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(8): a011288.

Haynie, J. L. and P. J. Bryant (1976). “Intercalary regeneration in imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*.” Nature **259**(5545): 659-62.

Heitzler, P. and P. Simpson (1991). “The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*.” Cell **64**(6): 1083-92.

Herranz, H. and M. Milan (2008). “Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in *Drosophila*.” Cell Cycle **7**(21): 3335-7.

Herrera, S. C., R. Martin, et al. (2013). “Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development.” PLoS Genet **9**(4): e1003446.

Hobmayer, B., F. Rentzsch, et al. (2000). “WNT signalling molecules act in axis formation in

the diploblastic metazoan Hydra.” Nature **407**(6801): 186-9.

Hobmayer, E., M. Hatta, et al. (1996). “Identification of a Hydra homologue of the beta-catenin/plakoglobin/armadillo gene family.” Gene **172**(1): 155-9.

Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). “Phylogenetic perspectives in innate immunity.” Science **284**(5418): 1313-8.

Huh, J. R., M. Guo, et al. (2004). “Compensatory proliferation induced by cell death in the Drosophila wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role.” Curr Biol **14**(14): 1262-6.

Igaki, T., H. Kanda, et al. (2002). “Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway.” EMBO J **21**(12): 3009-18.

Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). “Programmed cell death in animal development.” Cell **88**(3): 347-54.

Johnston, L. A. and B. A. Edgar (1998). “*Wingless* and *Notch* regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing.” Nature **394**: 82-84.

Katsuyama, T. and R. Paro (2011). “Epigenetic reprogramming during tissue regeneration.” FEBS Lett **585**(11): 1617-24.

Kornberg, T., I. Siden, et al. (1985). “The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression.” Cell **40**(1): 45-53.

Labus, M. B., C. M. Stirk, et al. (1998). “Expression of Wnt genes in early wound healing.” Wound Repair Regen **6**(1): 58-64.

Lawrence, P. A. and G. Morata (1976). “Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the *engrailed* gene.” Dev. Biol. **50**: 321-337.

Lawrence, P. A. and G. Struhl (1996). “Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila?” Cell **85**(7): 951-61.

Lee, N., C. Maurange, et al. (2005). "Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs." Nature **438**(7065): 234-7.

Lepilina, A., A. N. Coon, et al. (2006). "A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration." Cell **127**(3): 607-19.

Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.

Martin, F. A. and G. Morata (2006). "Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc." Development **133**(22): 4421-6.

Martin, F. A., A. Perez-Garijo, et al. (2009). "Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells." Int J Dev Biol **53**(8-10): 1341-7.

Martin, F. A., A. Perez-Garijo, et al. (2004). "The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*." Development **131**(20): 4921-30.

Martin-Blanco, E., J. C. Pastor-Pareja, et al. (2000). "JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7888-93.

Martin-Castellanos, C. and B. A. Edgar (2002). "A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing." Development **129**(4): 1003-13.

Mattila, J., L. Omelyanchuk, et al. (2005). "Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc." Int J Dev Biol **49**(4): 391-9.

Maves, L. and G. Schubiger (1995). "Wingless induces transdetermination in developing *Drosophila* imaginal discs." Development **121**(5): 1263-72.

Maves, L. and G. Schubiger (1998). "A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling." Development

125(1): 115-24.

Mehic, D., L. Bakiri, et al. (2005). "Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes." J Invest Dermatol **124(1): 212-20.**

Meinhardt, H. (1982). Models of Biological Pattern formation. London, Academic Press Inc.

Methot, N. and K. Basler (1999). "Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus." Cell **96(6): 819-31.**

Mohler, J., M. Seecoomar, et al. (2000). "Activation of knot (kn) specifies the 3-4 intervein region in the Drosophila wing." Development **127(1): 55-63.**

Moreno, E., M. Yan, et al. (2002). "Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily." Curr Biol **12(14): 1263-8.**

Morgan, T. H. (1901). "Regeneration and Liability to Injury." Science **14(346): 235-48.**

Mullor, J. L., M. Calleja, et al. (1997). "Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning." Development **124(6): 1227-37.**

Nakamura, K., N. Maki, et al. (2010). "miRNAs in newt lens regeneration: specific control of proliferation and evidence for miRNA networking." PLoS One **5(8): e12058.**

Nestoras, K., H. Lee, et al. (1997). "Role of knot (kn) in wing patterning in Drosophila." Genetics **147(3): 1203-12.**

Nolo, R., L. A. Abbott, et al. (2000). "Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in Drosophila." Cell **102(3): 349-62.**

Ng, M., F. J. Díaz-Benjumea, et al. (1996). "Specification of the wing by localized expression of Wingless protein." Nature **381: 316-318.**

Panin, V. M., V. Papayannopoulos, et al. (1997). "*fringe* modulates Notch-ligand interac-

tions." Nature **387**: 908-912.

Pare, A., M. Kim, et al. (2012). "The functions of grainy head-like proteins in animals and fungi and the evolution of apical extracellular barriers." PLoS One **7**(5): e36254.

Pastor-Pareja, J. C., F. Grawe, et al. (2004). "Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade." Dev Cell **7**(3): 387-99.

Pastor-Pareja, J. C., M. Wu, et al. (2008). "An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*." Dis Model Mech **1**(2-3): 144-54; discussion 153.

Pearson, J. C., M. T. Juarez, et al. (2009). "Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(7): 2224-9.

Perez-Garijo, A., Y. Fuchs, et al. (2013). "Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway." Elife **2**: e01004.

Perez-Garijo, A., F. A. Martin, et al. (2004). "Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*." Development **131**(22): 5591-8.

Poss, K. D., L. G. Wilson, et al. (2002). "Heart regeneration in zebrafish." Science **298**(5601): 2188-90.

Rafferty, L. A., M. Sanicola, et al. (1991). "The relationships of *decapentaplegic* and *engrailed* expression in *Drosophila* imaginal discs: do these genes mark the anterior-posterior compartment boundary?" Development **113**: 27-33.

Reinhardt, C. A., N. M. Hodgkin, et al. (1977). "Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. I. Scanning electron microscopy of normal and healing wing discs." Dev Biol **60**(1): 238-57.

Repiso, A., C. Bergantinos, et al. (2013). "Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs." Development **140**(17): 3541-51.

Richardson, H. and S. Kumar (2002). "Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death." J Immunol Methods **265**(1-2): 21-38.

Riedy, M. C., E. A. Timm, Jr., et al. (1995). "Quantitative RT-PCR for measuring gene expression." Biotechniques **18**(1): 70-4, 76.

Ryoo, H. D., T. Gorenc, et al. (2004). "Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways." Dev Cell **7**(4): 491-501.

Sainson, R. C., J. Aoto, et al. (2005). "Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis." FASEB J **19**(8): 1027-9.

San Juan, B. P., I. Andrade-Zapata, et al. (2012). "The bHLH factors Dpn and members of the E(spl) complex mediate the function of Notch signalling regulating cell proliferation during wing disc development." Biol Open **1**(7): 667-76.

Sanchez Alvarado, A. and P. A. Tsonis (2006). "Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models." Nat Rev Genet **7**(11): 873-84.

Sanicola, M., J. J. Sekelsky, et al. (1995). "Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: Negative regulation of *decapentaplegic* and *patched* expression by *engrailed*." Genetics **139**(2): 745-756.

Schubiger, G. (1973). "Regeneration of *Drosophila melanogaster* male leg disc fragments in sugar fed female hosts." Experientia **29**(5): 631-2.

Schubiger, M., A. Sustar, et al. (2010). "Regeneration and transdetermination: the role of wingless and its regulation." Dev Biol **347**(2): 315-24.

Schwank, G., S. Dalessi, et al. (2011). "Formation of the long range Dpp morphogen gradient." PLoS Biol **9**(7): e1001111.

Shaw, T. J. and P. Martin (2009). "Wound repair at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 18): 3209-13.

Shearn, A., A. Martin, et al. (1984). "Genetic analysis of transdetermination in *Drosophila*. I. The effects of varying growth parameters using a temperature-sensitive mutation." Dev Biol **106**(1): 135-46.

Shingleton, A. W. (2010). "The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force." Organogenesis **6**(2): 76-87.

Shlevkov, E. and G. Morata (2012). "A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*." Cell Death Differ **19**(3): 451-60.

Smith-Bolton, R. K., M. I. Worley, et al. (2009). "Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc." Dev Cell **16**(6): 797-809.

Solter, D., T. Hiriagi, et al. (2004). "Epigenetic mechanisms in early mammalian development." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **69**: 11-7.

Sparmann, A. and M. van Lohuizen (2006). "Polycomb silencers control cell fate, development and cancer." Nat Rev Cancer **6**(11): 846-56.

Staley, B. K. and K. D. Irvine (2012). "Hippo signaling in *Drosophila*: recent advances and insights." Dev Dyn **241**(1): 3-15.

Sun, G. and K. D. Irvine (2011). "Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors." Dev Biol **350**(1): 139-51.

Szabad, J., P. Simpson, et al. (1979). "Regeneration and compartments in *Drosophila*." J Embryol Exp Morphol **49**: 229-41.

Tabata, T., C. Schwartz, et al. (1995). "Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of *engrailed* and the compartment hypothesis." Development **121**: 3359-3369.

Thomas, B. J., K. H. Zavitz, et al. (1997). "roughex down-regulates G2 cyclins in G1." Genes Dev **11**(10): 1289-98.

Vervoort, M., M. Crozatier, et al. (1999). "The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the Drosophila wing." Curr Biol **9**(12): 632-9.

White, K., M. E. Grether, et al. (1994). "Genetic control of programmed cell death in Drosophila." Science **264**(5159): 677-83.

Widelitz, R. (2005). "Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress." Growth Factors **23**(2): 111-6.

Williams, J. A., S. W. Paddock, et al. (1993). "Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing Drosophila wing disc into discrete sub-regions." Development **117**(2): 571-84.

Williams, J. A., S. W. Paddock, et al. (1994). "Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorso/ventral compartment boundary." Nature **368**: 299-305.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. and Meyerowitz, E. (1998). "Principles of Development." Oxford University Press.

Worley, M. I., L. Setiawan, et al. (2012). "Regeneration and transdetermination in Drosophila imaginal discs." Annu Rev Genet **46**: 289-310.

Yates, S. and T. E. Rayner (2002). "Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization." Wound Repair Regen **10**(1): 5-15.

Yin, V. P. and K. D. Poss (2008). "New regulators of vertebrate appendage regeneration." Curr Opin Genet Dev **18**(4): 381-6.

Zecca, M., K. Basler, et al. (1995). "Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing." Development **121**(8): 2265-78.

Zeidler, M. P., N. Perrimon, et al. (2000). "Multiple roles for four-jointed in planar polarity and limb patterning." Dev Biol **228**(2): 181-96.

Zhang, B., W. C. Xiong, et al. (2009). "Get ready to Wnt: prepatternning in neuromuscular junction formation." Dev Cell **16**(3): 325-7.

Anexo I: Abreviaturas

°C: Grado Centígrado

A: Anterior

ADN: Ácido desoxiribonucleico

a-cv: “anterior-crossvein” (crosvena anterior)

A/P: Borde Antero-Posterior

AEL: “After Egg Laying” (Después de la puesta del huevo)

ap: apterous

APF: “After Puparium Formation” (Después de la formación del pupario)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNi: Ácido Ribonucleico interferente

b-Gal: beta-Galactosidasa

BL: Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University

Bs: Blistered

BSA: “Bovine Serum Albumine” (Suero de albúmina bovina)

CA: Constitutivamente Activo

Cas3: Caspasa 3

CycE: Ciclina E

D: Dorsal

DC: Después del Corte

DI: Delta

dome: domeless

D/V: Borde Dorso-Ventral

EC: Epitelio Columnar

EGFR: “Epidermal Growth Factor Receptor” (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)

egr: eiger

en: engrailed

Abreviaturas

E(spl): Enhancer of split

EP: Epitelio Peripodial

GFP: "Green Fluorescent Protein" (Proteína verde fluorescente)

h(s): hora(s)

hep: hemipterous

Hpo: Hippo

HSW: Ruta de Hippo Salvador y Warts

Hth: Homothorax

Hh: Hedgehog

hop: hopscotch

IAP: "Inhibitor of Apoptosis Proteins" (Proteínas inhibidoras de apoptosis)

iro-C: Complejo Iroquois

JNK: Jun N-terminal Kinases

L1-6: Venas longitudinales 1-6

Mad: Mother against dpp

N: Notch

nub: nubbin

P: Posterior

PBS: "Phosphate Buffered Saline" (Buffer salino fosfatado)

PBT: "Phosphate Buffered Saline + 0,3% Triton" (Buffer salino fosfatado con el 0,3% de Tritón)

p/c: pupación con respecto al corte

PcG: "Polycomb Group proteins" (Proteínas del grupo Polycomb)

PCR: "Polimerase Chain Reaction" (Reacción en cadena de la polimerasa)

p-cv: "posterior crossvein" (crosvena posterior)

Phall: Phalloidina

PH3: Fosfo-Histona3

psc: posterior sex comb

ptc: patch

puc: puckered

R: Recuperación

Rbf: Factor de Retinoblastoma

RFP: “Red Fluorescent Protein” (Proteína roja fluorescente)

rn: rotund

rux: roughest

Sal: Spalt

TrxG: Trithorax Group proteins (Grupo de proteínas Trithorax)

Ts: termosensible

Tub: tubulina

UAS: “Upstream Activating Sequence”

Upd: unpaired

V: Ventral

wg: wingless

Wts: Warts

Yki: Yorkie

Zfh2: Zn finger homeodomain 2

Anexo II: Agradecimientos

